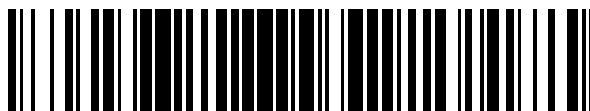


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 978**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/576** (2006.01)  
**C07K 14/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05810417 .5**  
96 Fecha de presentación: **26.08.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1799868**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

54 Título: **Mutantes de proteínas no estructurales de VHC y usos de los mismos**

30 Prioridad:  
27.08.2004 US 604858 P  
12.10.2004 US 618390 P  
22.10.2004 US 621502 P  
25.10.2004 US 621790 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.04.2012**

73 Titular/es:  
**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.**  
**INTELLECTUAL PROPERTY - R440**  
**P.O. BOX 8097**  
**EMERYVILLE, CA 94662-8097, US**

72 Inventor/es:  
**CHIEN, David Y.;**  
**COIT, Doris;**  
**HU, Celine Yuan-Hwei;**  
**LIN, Sansan y**  
**MEDINA-SELBY, Angelica**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 377 978 T3

## DESCRIPCIÓN

Mutantes de proteínas no estructurales del VHC y usos de los mismos

**Campo de la técnica**

La presente revelación se refiere a, en general, construcciones del virus de la hepatitis C (VHC) y a procedimientos de uso de los mismos. Más particularmente, la invención se refiere a proteínas inmunogénicas e inmunorreactivas del VHC con dominios modificados de la NS3 proteasa, de modo que se inhibe la actividad proteolítica de la molécula NS3. Las proteínas modificadas conservan los epítopos conformacionales y, por tanto, son útiles en inmunoensayos para el diagnóstico de la infección por VHC, así como para estimular la respuesta inmunitaria frente al VHC.

**Antecedentes de la invención**

El virus de la hepatitis C (VHC) es la causa principal de la hepatitis persistente (NANBH), que se transmite, principalmente, mediante transfusiones de sangre y intercambio de fluidos corporales. El virus está presente en el 0,4-2,0% de la población general de EE.UU. La hepatitis crónica se desarrolla en aproximadamente un 50% de las infecciones y, de éstas, aproximadamente el 20% de los individuos infectados desarrolla cirrosis hepática que, en ocasiones, conduce a carcinoma hepatocelular. En consecuencia, el estudio y control de la enfermedad es de importancia médica.

Houghton y col. identificaron y caracterizaron por primera vez el VHC, como causa de NANBH. Se conoce la secuencia genómica viral del VHC, como lo son los procedimientos para obtener la secuencia. Véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales n° WO 89/04669 WO 90/11089 y WO 90/14436. El VHC tiene genoma de ARN monocatenario de 9,5 kb de sentido positivo y es miembro de la familia Flaviridae de virus. Sobre la base del análisis filogenético se han identificado al menos seis genotipos distintos aunque relacionados del VHC (Simmonds y col., J. Gen. Virol. (1993) 74:2391-2399). El virus codifica una única poliproteína que tiene más de 3000 residuos de aminoácidos (Choo y col., Science (1989) 244:359-362; Choo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2451-2455; Han y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:1711-1715). La poliproteína se procesa al mismo tiempo y después de la traducción en proteínas tanto estructurales como no estructurales (NE).

En particular, como se muestra en la Figura 1, en el genoma del VHC se codifican varias proteínas. El orden y la nomenclatura de los productos de la escisión de la poliproteína del VHC es el siguiente: NH2-C-E1-E2-P7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. La escisión inicial de la poliproteína está catalizada por las proteasas del huésped, que liberan tres posibles proteínas estructurales compuestas por la proteína N-terminal de la nucleocápside (denominada "del núcleo" y dos glicoproteínas de la cubierta, "E1" (también conocida como E) y "E2" (también conocida como E2/NS1), así como proteínas no estructurales (NS) que contienen las enzimas virales. Las regiones NS se denominan NS2, NS3, NS4, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b. NS2 es una proteína integral de la membrana que posee actividad proteolítica. NS2, sola o en combinación con NS3, escinde el enlace scissile NS2-NS3 que, a su vez, genera el extremo NS3 N y libera una poliproteína grande que incluye las actividades serina proteasa y ARN helicasa. La proteasa NS3 sirve para procesar el resto de la poliproteína. En concreto, la proteína NS3 del VHC es una proteína de 630 aminoácidos que contiene tres dominios funcionales. El dominio de tipo serina proteasa se localiza en el extremo amino, mientras que la actividad helicasa y NTPasa están en el extremo carboxi. La serina proteasa de NS3 es responsable de la escisión en la unión de NS3/4a, NS4a/b, NS4b/5a y NS5a/b.

Se ha descrito una serie de polipéptidos generales y específicos útiles como reactivos inmunológicos y diagnósticos para el VHC, derivado de la poliproteína del VHC. Véase, por ejemplo, Houghton y col., publicación europea n° 318.216 y 388.232; Choo y col., Science (1989) 244:359-362; Kno y col., Science (1989) 244:362-364; Houghton y col., Hepatology (1991) 14:381-388; Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien y col., J. Gastroent. He patol. (1993) 8:533-39; Chien y col., publicación internacional N° WO 93/00365; Chien, D.Y., publicación internacional N° WO 94/01778. Estas publicaciones proporcionan una extensa información básica sobre el VHC en general, así como sobre la fabricación y usos de los reactivos inmunológicos del polipéptido del VHC.

Procedimientos sensibles y específicos para la detección selectiva y la identificación de portadores de VHC y de sangre o productos sanguíneos contaminados por el VHC proporcionarían un importante avance en medicina. La hepatitis postransfusional (HPT) se produce en aproximadamente el 10 % de los pacientes transfundidos y el VHC ha sido responsable de hasta el 90 % de estos casos. Los cuidados del paciente, así como la prevención y la transmisión del VHC por sangre y productos sanguíneos o mediante contacto personal íntimo requieren herramientas diagnósticas y pronósticas. De acuerdo con esto, se han desarrollado varios ensayos para el serodiagnóstico de la infección por VHC. Véase, por ejemplo, Choo y col., Science (1989) 244:359-362; Kuo y col., Science (1989) 244:362-364; Choo y col., Br. Med. Bull. (1990) 46: Véase, Ebeling y col., Lancet (1990) 335:982-983; van der Poel y col., Lancet (1990) 335:558-560; van der Poel y col., Lancet (1991) 337:317-319; Chien, D.Y., publicación internacional N° WO 94/01778; Valenzuela y col., publicación internacional N° WO 97/44469; y Kashiwakuma y col., patente de EE.UU. n° 5.871.904.

La patente de EE.UU. n° 6.632.601 describe inmunoensayos usando epítopos conformacionales NS3/4a en combinación con antígenos de fusión de múltiples epítopos (MEFA). Los ensayos proporcionan procedimientos

sensibles y fiables para detectar la seroconversión temprana del VHC. NS3/4a, expresada en levaduras y purificada en condiciones no desnaturalizantes, tal como se describe en la patente de EE.UU. nº 6.632.601, contiene las funciones de proteasa y helicasa. Dado que la NS3/4a purificada de este modo conserva la conformación nativa, se ha descubierto que es más sensible que los antígenos c20 o c33c en la detección de anticuerpos de seroconversión temprana. En los ensayos de anticuerpos con NS3/4a y MEFA 7.1 como antígenos, se detectaron anticuerpos de seroconversión 2-14 días antes que los ensayos para VHC comercializados en la actualidad. No obstante, la proteína NS3/4a sufre autohidrólisis y escinde el MEFA 7.1 debido a la actividad de NS3 proteasa.

Las publicaciones internacionales nº WO 04/00547 y WO 01/38360 describen proteínas del VHC que incluyen dominios mutados de NS3 proteasa con menor actividad proteolítica. No obstante, sigue existiendo la necesidad de herramientas diagnósticas y pronósticas sensibles y precisas con el fin de proporcionar una adecuada atención al paciente, además de para prevenir la transmisión del VHC mediante sangre y productos hemoderivados o mediante contacto personal estrecho. Los documentos WO 01/38360 y WO 2004/005473 divulgan polipéptidos que comprenden un dominio de proteasa NS3 de VHC, en el que la actividad proteasa del dominio está inhibida, así como soportes de inmunoensayo que comprenden los polipéptidos. El documento WO 2004/005473 también divulga sustituciones de aminoácidos correspondientes a His-1083, Asp-1105 y/o Ser-1165, incluida la sustitución de Ala por el aminoácido correspondiente a Ser-1165. El documento WO 01/96870 divulga un epítipo conformacional de NS3/4a que difiere de la secuencia nativa en las posiciones de aminoácidos 1428 y 1429 de la secuencia de longitud completa del VHC-1 en la que la Thr que normalmente está en la posición 1428 ha mutado a Pro y la Ser que normalmente está en la posición 1429 ha mutado a Ile. Este epítipo se usa en inmunoensayos para el diagnóstico del VHC.

### **Sumario de la invención**

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que el uso de los polipéptidos NS3 del VHC con dominios proteasa modificados proporciona reactivos mejores los para detectar infección por VHC. Los polipéptidos NS3 modificados conservan los epítipos conformacionales y, por tanto, inmunorreactividad, al tiempo que eliminan la actividad proteasa. Dado que los polipéptidos NS3 están modificados para eliminar la actividad proteasa, son especialmente útiles con otros polipéptidos del VHC que conservan sitios de escisión proteolítica de NS3 que, de otro modo, se escindirían proteolíticamente mediante una proteasa NS3 funcional. Por tanto, los polipéptidos de NS3 modificados se pueden usar solos o en combinación con otros reactivos del VHC y, en particular, con antígenos de fusión de múltiples epítipos (MEFA) para detectar de forma eficaz y precisa la presencia de infección por VHC. El uso de MEFA proporciona las ventajas añadidas de disminución de problemas de enmascaramiento, mejora de la selectividad y mejora de la sensibilidad para detectar anticuerpos permitiendo un mayor número de epítipos en una unidad de área de sustrato. Los ensayos descritos en el presente documento se pueden usar para detectar infección por VHC producida por cualquiera de los seis genotipos conocidos del VHC.

La invención está dirigida a un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 2, 4 o 6, en la que el polipéptido comprende un epítipo conformacional de NS3. En realizaciones adicionales, la invención está dirigida a un soporte sólido de inmunoensayo que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID 2, 4 ó 6, que reacciona específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC.

En otras realizaciones adicionales, el soporte sólido de inmunoensayo comprende además un antígeno de fusión de múltiples epítipos unido al soporte, en el que el antígeno de fusión de múltiples epítipos reacciona específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC.

En ciertas realizaciones, el antígeno de fusión de múltiples epítipos comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID Nº 10, o una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 80 %, tal como al menos 90 % o al menos una identidad de secuencia del 98 %, y que reacciona específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC. En realizaciones adicionales, el antígeno de fusión de múltiples epítipos consta de la secuencia de aminoácidos representados en la SEC ID Nº 10.

En realizaciones adicionales, la invención está dirigida a un procedimiento de detección de la infección del VHC en una muestra biológica. El procedimiento comprende:

- (a) proporcionar un soporte sólido de inmunoensayo como se ha descrito anteriormente;
- (b) combinar una muestra biológica con el soporte sólido en condiciones que permitan que los anticuerpos anti-VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, se unan al polipéptido y/o el antígeno de fusión de múltiples epítipos para formar un primer complejo inmunitario;
- (c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones formadoras de complejo un anticuerpo marcado de forma que se pueda detectar, en el que el anticuerpo marcado reacciona con el complejo inmunitario; y
- (d) detectar un segundo complejo inmunitario formado entre el anticuerpo marcado de forma que se pueda detectar y el primer complejo inmunitario, si existe, como indicación de infección por VHC en la muestra biológica.

En otras realizaciones adicionales más, la invención está dirigida a un kit de prueba inmunodiagnóstica que comprende un soporte sólido de inmunoensayo tal como se ha descrito anteriormente, e instrucciones para realizar la prueba inmunodiagnóstica.

5 En otras realizaciones adicionales más, la invención está dirigida a un polinucleótido que comprende una secuencia codificadora para un o cual quiera de los polipéptidos anteriores y un vector recombinante que comprende el polinucleótido y elementos control unidos de forma operable al polinucleótido, a través de lo cual la secuencia codificadora se puede transcribir y traducir en una célula huésped. En realizaciones adicionales, la invención está dirigida a una célula huésped transformada con el vector recombinante. En realizaciones adicionales más, la invención está dirigida a un procedimiento para producir un polipéptido recombinante, que comprende:

- 10 (a) proporcionar una población de células huésped descrita anteriormente; y  
(b) cultivar la población de células en condiciones mediante las cuales se expresa el polipéptido codificado por la secuencia codificadora presente en el vector recombinante.

En realizaciones adicionales más, la invención está dirigida a un procedimiento para producir un soporte sólido de inmunoensayo, que comprende:

- 15 (a) proporcionar un soporte sólido; y  
(b) unir al soporte sólido al menos un polipéptido tal como se ha descrito anteriormente.

En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende además unir al soporte sólido en una posición pequeña un antígeno de fusión de múltiples epítopos.

20 Estos y otros aspectos de la presente invención se pondrán de manifiesto mediante referencia a las siguientes Figuras y Descripción detallada. Además, en el presente documento se exponen varias referencias que describen con más detalle procedimientos o composiciones.

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación en diagrama del genoma del VHC, que representa las diversas regiones de la poliproteína de la cual derivan los presentes reactivos del ensayo (proteínas y anticuerpos).

25 La Figura 2 es un dibujo esquemático de un inmunoensayo representativo que usa polipéptidos modificados de NS3 de acuerdo con la invención, en el que los antígenos del VHC están inmovilizados sobre un soporte sólido.

La Figura 3 (SEC ID N° 7 y 8) representan el ADN y la correspondiente secuencia de aminoácidos de un dominio de proteasa NS3 nativo, sin modificar, representativo.

30 Las Figuras 4A-4C son representaciones en diagrama de proteínas NS3 mutantes de acuerdo con la invención. En las Figuras 4A-4C, la Ser normalmente presente en la posición 1165 está sustituida por Ala. Adicionalmente, todos los mutantes representados en las Figuras 4A-4C incluyen una sustitución de Pro por Thr normalmente presente en la posición 1428 e Ile por la Ser normalmente presente en la posición 1429. En la Figura 4A, la proteína incluye en dirección N-terminal a C-terminal, una Met en N-terminal, los aminoácidos 1027-1657 de NS3 y los aminoácidos 1658-1711 de NS4a y, por tanto, incluye los dominios NS3 y NS4a de longitud completa de la poliproteína del VHC.  
35 En la Figura 4B, la proteína incluye en dirección N-terminal a C-terminal, una Met en N-terminal y los aminoácidos 1027-1657 de NS3 y, por tanto, incluye los dominios NS3 de longitud completa de la poliproteína del VHC. En la Figura 4C, la proteína incluye en dirección N-terminal a C-terminal, una Met en N-terminal y los aminoácidos 1678-1690 de NS4a, seguida de la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Ser, después los aminoácidos 1029 a 1657 de NS3.

40 Las Figuras 5A-5C (SEC ID N° 1 y 2) representan la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la proteína de la Figura 4A, denominada "NS34aPI.1165."

Las Figuras 6A-6C (SEC ID N° 3 y 4) representan la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la proteína de la Figura 4B, denominada "NS3PI.1165."

45 Las Figuras 7A-7C (SEC ID N° 5 y 6) representan la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la proteína de la Figura 4C, denominada "d.4a.t.NS3PI.1165."

La Figura 8 es una representación en diagrama del MEFA 7.1.

Las Figuras 9A-9F (SEC ID N° 9 y 10) representan el ADN y la correspondiente secuencia de aminoácidos del MEFA 7.1.

La Figura 10 es un diagrama a fotografía de la construcción de pd.HCV1a.ns3ns4aPI.

50 Las Figuras 11A-11C muestran MEFA representativos para usar con los inmunoensayos objeto. La Figura 11A es una representación en diagrama de MEFA 3. La Figura 11B es una representación en diagrama de MEFA 5. La

Figura 11C es una representación en diagrama de MEFA 6.

La Figura 12 es un dibujo esquemático de un formato de inmunoensayo representativo que usa polipéptidos de NS3 modificados con un soporte sólido revestido con estreptavidina.

La Figura 13 es una representación de un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, que demuestra que las proteínas mutantes NS3 no sufren autohidrólisis y no escinden el MEFA 7.1. Carril 1: NS3aPI; Carril 2: NS34aPI.1165; carril 3: NS3PI.1165; carril 4: NS34aPI + MEFA 7.1, t=0; Carril 5: NS34aPI + MEFA 7.1, t=40 min; Carril 6: NS34aPI + MEFA 7.1, t=2 h; Carril 7: NS34aPI.1165 + MEFA 7.1, t=0; Carril 8: NS34aPI.1165 + MEFA 7.1, t=40 min; Carril 9: NS34aPI.1165 + MEFA 7.1, t=2 h; Carril 10: NS34aPI.1165 + MEFA 7.1, t=0; Carril 11: NS3PI.1165 + MEFA 7.1, t=40 min; Carril 12: NS3PI.1165 + MEFA 7.1, t=2 h; Carril 13: MEFA 7.1.

La Figura 14 es una representación de una transferencia Western usando anti-SOD como anticuerpo primario contra MEFA 7.1 y HRP anti-ratón como anticuerpo secundario, lo que demuestra que las proteínas mutantes NS3 no sufren autohidrólisis y no escinden el MEFA 7.1. Carril 1: NS34aPI; Carril 2: NS34aPI.1165; carril 3: NS3PI.1165; carril 4: NS34aPI + MEFA 7.1, t=0; Carril 5: NS34aPI + MEFA 7.1, t=40 min; Carril 6: NS34aPI + MEFA 7.1, t=2 h; Carril 7: NS34aPI.1165 + MEFA 7.1, t=0; Carril 8: NS34aPI.1165 + MEFA 7.1, t=40 min; Carril 9: NS34aPI.1165 + MEFA 7.1, t=2 h; Carril 10: NS3PI.1165 + MEFA 7.1, t=0; Carril 11: NS3PI.1165 + MEFA 7.1, t=40 min; Carril 12: NS3PI.1165 + MEFA 7.1, t=2 h; Carril 13: MEFA 7.1.

### Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, técnicas de ADN recombinante e inmunología, dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la literatura. Véase, por ejemplo, Fundamental Virology, 2ª Edición, vol. I y II (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds.); Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

También cabe indicar que, como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "uno", "una" y "el/la" comprenden las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye una mezcla de dos o más antígenos y similares.

A lo largo del texto se usan las siguientes abreviaturas de aminoácidos:

|                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|
| Alanina: Ala (A)         | Arginina: Arg (R)        |
| Asparagina: Asn (N)      | Ácido aspártico: Asp (D) |
| Cisteína: Cys (C)        | Glutamina: Gln (Q)       |
| Ácido glutámico: Glu (E) | Glicina: Gly (G)         |
| Histidina: His (H)       | Isoleucina: Ile (I)      |
| Leucina: Leu (L)         | Lisina: Lys (K)          |
| Metionina: Met (M)       | Fenilalanina: Phe (F)    |
| Prolina: Pro (P)         | Serina: Ser (S)          |
| Treonina: Thr (T)        | Triptófano: Trp (W)      |
| Tirosina: Tyr (Y)        | Valina: Val (V)          |

### I. Definiciones

Al describir la presente invención se emplearán los términos siguientes y se pretende definirlos como se indica a continuación.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de residuos de aminoácido y no están limitados a una longitud mínima del producto. Por tanto, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares están incluidos dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa como fragmentos de las mismas están dentro de la definición. Los términos también incluyen las modificaciones postexpresión del polipéptido, por ejemplo glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. De forma adicional, para los fines de la presente invención un "polipéptido" se

refiere a una proteína que incluye “modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservadora), en la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como las realizadas mediante mutagénesis dirigida al sitio, o puede ser accidental, tal como mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debido a la amplificación por PCR.

Un polipéptido del VHC es un polipéptido, como se ha definido anteriormente, derivado de la poliproteína del VHC. El polipéptido no tiene que derivar físicamente del VHC, pero puede producirse de forma sintética o recombinante. Además, el polipéptido puede derivar de cualquier de las diversas cepas y aislamientos del VHC, tales como, entre otros, cualquiera de los aislamientos de las cepas 1, 2, 3, 4, 5 o 6 del VHC. Se conocen numerosas regiones conservadas y variables entre estas cepas y, en general, las secuencias de aminoácidos de los epítomos derivados de estas regiones tendrán un grado alto de homología de secuencia, por ejemplo una homología de secuencia de aminoácidos superior al 30 %, preferentemente superior al 40 %, cuando las dos secuencias están alineadas. Por tanto, por ejemplo, el término polipéptido “NS3/4a” se refiere a NS3/4a nativa de cualquiera de las diversas cepas del VHC, así como análogos, muteínas y fragmentos inmunogénicos de “NS3/4a”, tal como se define adicionalmente más adelante. Los genotipos completos de muchas de estas cepas se conocen. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 6.150.087 y los números de registro en GenBank AJ238800 y AJ238799.

Con un polipéptido “derivado de” una poliproteína del VHC se quiere decir un polipéptido que comprende una secuencia de una o más regiones o porciones de regiones de la poliproteína del VHC de referencia. Normalmente, el polipéptido está compuesto por regiones o porciones de regiones que incluyen epítomos y, en general, tienen una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a la del polipéptido de referencia, como se define más adelante. Por tanto, la expresión “derivado de” se usa para identificar la fuente original de una molécula, pero no se pretende limitar el procedimiento mediante el cual se produce la molécula que puede ser, por ejemplo, mediante síntesis química o medios recombinantes.

Los términos “análogo” y “muteína” hace referencia a derivados biológicamente activos de la molécula de referencia, o fragmentos de dichos derivados, que conservan la actividad deseada, tal como inmunorreactividad en los ensayos que se describen en el presente documento. En general, el término “análogo” hace referencia a compuestos que tienen una secuencia y estructura de polipéptidos nativa con una o más adiciones, sustituciones (en general de naturaleza conservadora o, en el caso de NS3 modificada, de naturaleza no conservadora en el sitio proteolítico activo) y/o delecciones de aminoácidos, respecto a la molécula nativa, siempre que las modificaciones no destruyan la actividad inmunogénica. El término “muteína” se refiere a polipéptidos que tienen una o más moléculas similares a aminoácidos, que incluyen, entre otros, compuestos que comprenden sólo moléculas amino y/o imino, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, moléculas naturales y no naturales (p. ej., sintéticas), en forma de ciclos, ramificadas y similares. El término también incluye moléculas que comprenden uno o más residuos de glicina N-sustituidos (un “peptido”) y otros aminoácidos o péptidos sintéticos. (Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.831.005; 5.877.278; y 5.977.301; Nguyen y col., Chem Biol. (2000) 7:463-473; y Simon y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:9367-9371 para descripciones de peptoides). Preferentemente, el análogo o muteína tiene al menos la misma inmunoreactividad que la molécula nativa. En la técnica se conocen procedimientos para fabricar análogos y muteínas de polipéptidos, y se describen adicionalmente más adelante.

Como se ha explicado anteriormente, los análogos incluyen, en general, sustituciones de naturaleza conservadora, es decir sustituciones que tienen lugar en una familia de aminoácidos que están relacionados por sus cadenas laterales. Específicamente, en general, los aminoácidos se dividen en cuatro familias: (1) ácidos – aspartato y glutamato; (2) básicos – lisina, arginina, histidina; (3) no polares – alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga – glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. En ocasiones, los aminoácidos fenilalanina, triptófano y tirosina se clasifican como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, es razonablemente predecible que una sustitución aislada de leucina con isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina o una sustitución conservadora similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Por ejemplo, el polipéptido de interés puede incluir hasta aproximadamente 5-10 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, o incluso hasta aproximadamente 15-25 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, o cualquier número entero entre 5-25 siempre que la función deseada de la molécula permanezca intacta. Un experto en la técnica puede determinar con facilidad regiones de la molécula de interés que pueden tolerar cambios con referencia a los gráficos de Hopp/Woods y Kyte-Doolittle, bien conocidos en la técnica.

Por “NS3 modificada” se quiere decir un polipéptido NS3 con una modificación tal que la actividad proteasa del polipéptido NS3 está alterada. Por tanto, los polipéptidos de NS3 modificados exhiben menos actividad proteasa en comparación con el polipéptido de NS3 parental sin modificar. La modificación puede incluir una o más adiciones, sustituciones (en general, de naturaleza no conservadora) y/o delecciones de aminoácidos respecto a la molécula nativa, en la que la susceptibilidad a la escisión proteolítica de NS3 se reduce o elimina. Más adelante se tratan procedimientos para medir la actividad proteasa.

Por "fragmento" se quiere decir un polipéptido que consiste en sólo una parte de la secuencia polipeptídica de longitud completa y de la estructura intactas. El fragmento puede incluir una delección en C-terminal y/o una delección en N-terminal del polipéptido nativo. Un "fragmento inmunogénico" de una proteína concreta del VHC incluirá, en general, al menos aproximadamente 5-10 residuos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa, preferentemente al menos aproximadamente 15-25 residuos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa y, más preferentemente, al menos aproximadamente 20-50 o más residuos de aminoácidos contiguos de la molécula de longitud completa, que definen un epítipo, o cualquier número entero entre 5 a aminoácidos y la secuencia de longitud completa, siempre que el fragmento en cuestión conserve inmunorreactividad en los ensayos descritos en el presente documento. Por ejemplo, los fragmentos inmunogénicos preferidos, incluyen, entre otros, fragmentos del núcleo del VHC que comprenden, por ejemplo, los aminoácidos 10-45, 10-53, 67-88 y 120-130 de la poliproteína, el epítipo 5-1-1 (en la región NS4a/NS4b del genoma viral), así como epítopos definidos derivados de cualquiera de las regiones de la poliproteína mostrada en la Figura 1, tal como, entre otros, E1, E2, NS3 (p. ej., un polipéptido c33c de la región NS3), NS4 (p. ej., el polipéptido c100 de las regiones NS3/NS4), las regiones NS3/4a y NS5 de la poliproteína del VHC, así como cualquiera de los demás epítopos identificados de la poliproteína del VHC. Véase, por ejemplo, Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chien y col., J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chien y col., publicación internacional n° WO 93/00 365; Chien, D. Y., publicación internacional n° WO 94/01778; patentes de EE.UU. n° 6.150.087 y 6.121.020.

El término "epítipo", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de al menos 3 a 5, preferentemente de aproximadamente 5 a 10 o 15, y no más de aproximadamente 1.000 aminoácidos (o cualquier número entero entre ellos), que definen una secuencia que, por sí misma o como parte de una secuencia más grande, se une a un anticuerpo generado como respuesta a dicha secuencia. No hay un límite superior crítico de la longitud del fragmento, que puede comprender casi toda la longitud de la secuencia proteica, o incluso una proteína de fusión que comprende dos o más epítopos de la poliproteína del VHC. Un epítipo para usar en la invención objeto no está limitado a un polipéptido que tenga la secuencia exacta de la porción de la proteína parental de la cual deriva. De hecho, los genomas virales están en un estado de flujo constante y contienen varios dominios variables que exhiben grandes cambios de variabilidad entre los aislamientos. Por tanto, el término "epítipo" abarca secuencias idénticas a la secuencia nativa, así como modificaciones de la secuencia nativa tales como delecciones, adiciones y sustituciones internas adicionales (normalmente de naturaleza conservadora).

Las regiones de un polipéptido dado que incluyen un epítipo se pueden identificar usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopos bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn

E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Por ejemplo, se pueden determinar epítopos lineales mediante, por ejemplo, síntesis concurrente de números elevados de péptidos sobre soportes sólidos, en los que los péptidos corresponden a porciones de la molécula proteica y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos siguen unidos a los soportes. Dichas técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.08.871; Geysen y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen y col. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:178-182; Geysen y col. (1986) Mol. Immunol. 23:709-715, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Usando dichas técnicas, se han identificado diversos epítopos del VHC. Véase, por ejemplo, Chien y col., Viral Hepatitis and Liver Disease (1994) pág. 320, -324 y más adelante. De forma similar, los epítopos conformacionales se identifican con facilidad determinando la conformación espacial de los aminoácidos, tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, anteriormente. Las regiones antigénicas de proteínas también se pueden identificar usando gráficos de antigenicidad e hidropatía convencionales, tales como los calculados usando, por ejemplo, el programa de software Omig a versión 1.0 disponible en Oxford Molecular Group. Este programa informático emplea el procedimiento de Hopp/Woods Hopp y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78:3824-3828 para determinar los perfiles de antigenicidad, y la técnica de Kyte-Doolittle, Kyte y col., J. Mol. Biol. (1982) 157:105-132 para gráficos de hidropatía.

Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo conformacional" se refiere a una porción de una proteína de longitud completa o un análogo o mutéina de la misma, que tiene características estructurales nativas de la secuencia de aminoácidos que codifica el epítipo en la proteína natural de longitud completa. Las características estructurales nativas incluyen, entre otras, glicosilación y estructura tridimensional. La longitud de la secuencia que define el epítipo puede estar sujeta a amplias variaciones, ya que se cree que estos epítopos están formados por la forma tridimensional del antígeno (p. ej., plegamiento). Por tanto, los aminoácidos que definen el epítipo pueden ser relativamente pocos en número pero ampliamente dispersados a lo largo de la longitud de la molécula, llegando a la correcta conformación del epítipo a través del plegamiento. Las porciones del antígeno entre los residuos que definen el epítipo pueden no ser cruciales para la estructura conformacional del epítipo. Por ejemplo, la delección o sustitución de estas secuencias intermedias pueden no afectar al epítipo conformacional siempre que las secuencias cruciales para la conformación del epítipo se mantengan (p. ej. las cisternas implicadas en los puentes disulfuro, los sitios de glicosilación etc.).

Los epítopos conformacionales presentes en la región NS3/4a, se identifican fácilmente usando procedimientos tratados anteriormente. Además, la presencia o ausencia de un epítipo conformacional en un polipéptido dado se puede determinar con facilidad mediante detección selectiva del antígeno de interés con un anticuerpo (suero

policlona l o monoclonal frente al e pítopo c onformacional) y com parando su re actividad co n la de una v ersión desnaturizada del antígeno que sólo conserva epítomos lineales (en su caso). En dicha detección selectiva usando anticuerpos policlonales, puede ser ventajoso absorber el suero policlona l primero con el antígeno desnaturizado y ver si conserva anticuerpos frente al antígeno de interés.

5 Preferentemente, un epítopo conformacional se produce de forma recombinante y se expresa en una célula a partir de la cual se puede extraer en condiciones que conserven sus características estructurales deseadas, por ejemplo sin desnaturización del epítopo. Dichas células incluyen células de bac terias, levaduras, insectos y de mamífero. La expresión y el aislamiento de epítomos conformacionales recombinantes de la proteína del VHC se describen en, por ejemplo, las publicaciones internacionales nº WO 96/04301, WO 94/01778, WO 95/33053, WO 92/08734. Como  
10 alternativa, es posi ble expresar los antígenos y renaturalizar después la proteína tras la recuperación. También se entiende q ue la síntesis q uímica puede tamb ién pro porcionar mim ítomos a ntigénicos c onformacionales q ue reaccionan de forma cruzada con el epítopo conformacional del antígeno "nativo".

La expresión "antígeno de fusión de múltiples epítomos" o "MEFA", como se usa en el presente documento quiere decir un polipéptido en el que múltiples antígenos virales están dispuestos como una cadena sencilla y continua de  
15 aminoácidos, cadena que no se produce en la naturaleza. Como se usa en el presente documento, los MEFA están limitados a a ntígenos d el VHC. Los antígenos del VH C pueden estar c onectados d irectamente entre sí mediante enlaces peptídicos o pueden estar separados por secuencias de aminoácidos intermedios. Los antígenos de fusión pueden tamb ién c ontener s ecuencias e xógenas a la poliproteína d el VHC. A demás, las s ecuencias del VH C presentes pueden proceder de múlti ples g enotipos y/o aislamientoes del VHC. Ejempl os de MEF A concretos p ara  
20 usar en los presentes inmunoensayos se detallan en, por ejemplo, la publicación internacional nº WO 97/44469; las patentes de EE.UU. nº 6.514.731, 6.428.792 y 6.632.601.

Un "a nticuerpo" quier e decir una molécula que se une e específicamente a un e pítopo de inter és presente en un antígeno. Por "se une específicamente" se quiere decir que el anticuerpo reconoce e interacciona con el epítopo mediante una interacción de tipo "llave y cerradura" para formar un complejo entre el antígeno y el anticuerpo, frente  
25 a la unión inespecífica que se podría producir entre el anticuerpo y, por ejemplo, el sustrato de prueba. Por tanto, por ejemplo, un anticuerpo del núcleo del VHC es una molécula que se une específicamente a la proteína del núcleo del VHC. El térmi no "a nticuerpo", como se u sa en el presente d ocumento, inclu ye l os anticuerpos obtenidos d e preparaciones tanto policlonales como monoclonales, así como de los siguientes: moléculas de anticuerpos híbridos (quiméricos (véase, por ejemplo, Winter y col. (1991) Nature 349:293-299; y la patente de EE.UU. nº 4.816.567); los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y F(ab); las moléculas Fv (heterodímeros no covalentes, véase, por ejemplo, Inbar y col. (1972) Proc Natl Aca d Sci USA 69:265 9-2662; y Ehrlich y col. (1980) Biochem 19:4091-4096); moléculas Fv de cadena sencilla (sFv) (véase, por ejemplo, Huston y col. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:5879-5883); construcciones de fragmentos de anticuerpos d iméricos y triméricos; minicuerpos (véase, por ejemplo, Pack y col. (1992) Biochem 31:1579-1584; Cumber y col. (1992) J Immunology 149B:120-126); moléculas de anticuerpos humanizados (véase, por ejemplo, Riechmann y col. (1988) Nature 332:323-327; Verhoevan y col. 1988; 239; 1534; -1536; y  
35

Publicación d e patente U.K. nº GB 2.276.1 69, publicada el 21 d e septi embre d e 1994); y, cualq uier fragmento funcional obtenido de d ichas moléculas, en el q ue dichos fragme ntos conserva n l as prop iedades de uni ón inmunológicas de la molécula del anticuerpo parental.

Como se us a en el pr esente documento, "anticuerpo monoclonal" se re fiere a un a composición d e anticuerpo que  
40 tiene un a población h omogénea de a nticuerpos. El térmi no no está limitado por las esp ecies o la fue nte d el anticuerpo, ni tampoco se pretende que esté limitado por el modo en el que se fabrica. Por tanto, el término abarca anticuerpos obtenidos de hibridomas murinos, así como de anticuerpos monoclonales humanos obtenidos usando hibridomas hu manos en l ugar de mur inos. Véase, por ejemplo, Cote y col. Monoclonal Antib odies and C ancer Therapy, Alan R. Liss, 1985, pág. 77.

45 Por "aislado" se quiere decir, al hacer referencia a un polipéptido, que la molécula indicada es distinta y pequeña del organismo entero con el cual la molécula se encuentra en la naturaleza o está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mis mo tip o. El té rmino "aislado" con r especto a un po linucleótido es u na molécula de á cido nucleico desprovista, todo o e n parte, de secu encias asoci adas n ormalmente c on el la en la naturaleza; o una secuencia, como existe en la naturaleza, pero que tiene secuencias heterólogas asociadas en ella; o una molécula disociada del cromosoma.  
50

Por "determinante antigénico equivalente" se quiere decir un determinante antigénico d e diferentes su bespecies o cepas de VHC, tal como las cepas 1, 2 o 3 del VHC. Más específicamente, se c onocen epítomos, como el "5-1-1", que se pr oducen aproximadamente en l as posiciones 1694-1735, numeradas respecto a la secu encia poliproteína del VHC-1 (véase la Figura 1) y dichos epítomos varían entre las cepas 1, 2 y 3. Por tanto, el epítopo 5-1-1 de las  
55 tres cepas diferentes son determinantes antigénicos equivalentes y, por tanto, son "c opias" aunque sus secuencias no sean idénticas. En general, las secuencias de aminoácidos de determinantes antigénicos equivalentes tendrán un grado alto de homología de secuencia, por ejemplo una homología de secuencia de aminoácidos superior al 30 %, preferentemente superior al 40 %, cuando las dos secuencias están alineadas.

“Homología” se refiere al porcentaje de similitud entre dos restos polinucleotídicos o dos polipeptídicos. Dos secuencias de ADN, o dos secuencias polipeptídicas, son “secuencialmente homólogas” entre sí cuando las secuencias exhiben al menos aproximadamente 50 %, preferentemente al menos aproximadamente 75 %, más preferentemente al menos aproximadamente 80-85 %, preferentemente al menos aproximadamente 90 % y más preferentemente al menos aproximadamente 95 %-98 % de similitud de secuencia sobre una longitud definida de las moléculas. Como se usa en el presente documento, sustancialmente homólogo también se refiere a moléculas que muestran identidad completa con el ADN o la secuencia polipeptídica especificados.

En general, “identidad” se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido-nucleótido o aminoácido-aminoácido de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, respectivamente. El porcentaje de identidad se puede determinar mediante una comparación directa de la información de la secuencia entre dos moléculas (la secuencia de referencia y una secuencia con % de identidad desconocido con respecto a la secuencia de referencia) alineando las secuencias, contando el número exacto de apareamientos entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia de referencia y multiplicando el resultado por 100.

Se pueden usar programas informáticos disponibles fácilmente para ayudar a la análisis de la homología y la identidad, tal como ALIGN, Dayhoff, M.O. en Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 3:353-358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Advances in Appl. Math. 2:482-489, 1981, 1981 para el análisis peptídico. Programas para determinar la homología de la secuencia nucleotídica están disponibles en el paquete Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 (disponible en Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también dependen del algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se usan fácilmente con los parámetros predeterminados recomendados por el fabricante y descritos en el paquete Wisconsin Sequence Analysis Package al que se ha hecho referencia anteriormente. Por ejemplo, el porcentaje de homología de una secuencia nucleotídica concreta con una secuencia de referencia se puede determinar usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuaciones predeterminadas y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótidos.

Otro procedimiento de establecer un porcentaje de homología en el contexto de la presente invención es usar el paquete MPSRCH de programas de cuayos derechos es propietario la University of Edinburgh, desarrollados por John F. Collins y Shane S. Sturrock, y distribuidos por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA) y este grupo de paquetes se puede emplear el algoritmo de Smith-Waterman en el que se usan los parámetros predeterminados para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por hueco abierto de 12, penalización por extensión de hueco de uno y un hueco de seis). De los datos generados, el valor “Correspondencia” refleja “homología de secuencia”. Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias generalmente se conocen en la técnica, por ejemplo otro programa de alineación es el BLAST, que se usa con parámetros predeterminados. Por ejemplo, BLAST N y BLAST P pueden usarse usando los siguientes parámetros predeterminados: Código genético= estándar; filtro= ninguno; hebra= ambas; corte= 60; previsto= 10; Matriz= BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificaciones por = PUNTUACIÓN ALT A; bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas están disponibles fácilmente.

Como alternativa, la homología se puede determinar mediante hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con nucleasa(s) específicas de una cadena y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas se pueden identificar en un experimento de hibridación de tipo southern, por ejemplo, condiciones estrictas tal y como se define para ese sistema concreto. La definición de las condiciones de hibridación adecuadas está dentro de la experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., ant.; DNA Cloning, ant.; Nucleic Acid Hybridization, ant.

Una “secuencia codificadora” o una secuencia que “codifica” un polipéptido seleccionado es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido in vitro o in vivo cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras adecuadas. Los límites de la secuencia codificadora están determinados por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia de terminación de la transcripción puede localizarse en 3' de la secuencia de codificación.

“Operablemente unido” se refiere a una organización de elementos en la que los componentes así descritos están configurados de modo que realizan su función deseada. Por tanto, un promotor dado operablemente unido a una secuencia codificadora es capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificadora cuando están presentes los factores de transcripción adecuados. El promotor no necesita estar contiguo a la secuencia codificadora, mientras que funcione dirigiendo su expresión. Por tanto, por ejemplo, las secuencias intermedias sin traducir pero transcritas pueden estar presentes entre la secuencia promotora y la secuencia codificadora, como también puede haber intrones transcritos, y la secuencia promotora puede seguir considerándose “unida operablemente” a la secuencia codificadora.

“Recombinante”, como se usa en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico significa un

polinucleótido de origen genómico, ADNc, viral, semisintético o sintético que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociada con nada o una porción del polinucleótido con el que está asociada en la naturaleza. El término “recombinante”, como se usa con respecto a una proteína o polipéptido quiere decir un polipéptido producido mediante la expresión de un polinucleótido recombinante. En general, el gen de interés se clona y después se expresa en organismos transformados, como se describe más adelante. El organismo huésped expresa el gen extraño para producir la proteína en condiciones de expresión.

Un “elemento control” se refiere a una secuencia de polinucleótidos que ayuda en la expresión de una secuencia codificadora a la que está unido. El término incluye promotores, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en 5', señales de poliadenilación, regiones no traducidas, incluidas 5'-UTR and 3'-UTR, y, cuando sea adecuado, secuencias líder y potenciadores, que, en conjunto, proporcionan la transcripción y traducción de una secuencia codificadora en una célula huésped.

Un “promotor”, como se usa en el presente documento, es una región reguladora de ADN capaz de unir la ARN polimerasa en una célula huésped e iniciar la transcripción de una secuencia codificadora (dirección 3') posterior unida operablemente al mismo. Para los fines de la presente invención, una secuencia promotora incluye el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción de un gen de interés a niveles detectables por encima del basal. Dentro de la secuencia promotora hay un sitio de inicio de la transcripción, así como dominios de unión a proteína (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucariotas a menudo, aunque no siempre, contienen cajas “TATA” y cajas “CAT”.

Una secuencia de control “dirige la transcripción” de una secuencia de codificación en una célula cuando la ARN polimerasa se une a la secuencia promotora y transcribe la secuencia codificadora en ARNm, que a su vez se traduce en el polipéptido codificado por la secuencia codificadora.

“Casete de expresión” o “construcción de expresión” se refiere a un ensamblaje que puede dirigir la expresión de la(s) secuencia(s) o gen(es) de interés. El casete de expresión incluye elementos de control, como se ha descrito anteriormente, tal como un promotor que está operablemente unido a la(s) secuencia(s) o gen(es) de interés (para dirigir su transcripción directa) y a menudo también incluye una secuencia de poliadenilación. En ciertas realizaciones de la invención, el casete de expresión descrito en el presente documento puede estar contenido dentro de una construcción plasmídica. Además de los componentes del casete de expresión, la construcción plasmídica puede también incluir uno o más marcadores seleccionables, una señal que permite que la construcción plasmídica exista como ADN monocatenario (p. ej., un origen de replicación de M13), al menos un sitio de clonación múltiple y un origen de replicación de “mamífero” (p. ej., un origen de replicación de SV40 o de adenovirus).

“Transformación”, como se usa en el presente documento, se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped, al margen del procedimiento usado para la inserción: por ejemplo, transformación mediante captación directa, transfección, infección y similares. Para procedimientos concretos de transfección, véase más adelante. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como vector no integrado, por ejemplo, un episoma, o, como alternativa, puede integrarse en el genoma del huésped.

Una “célula huésped” es una célula que se ha transformado, o es capaz de transformarse, con una secuencia de ADN exógeno.

Como se usa en el presente documento, una “muestra biológica” se refiere a una muestra de tejido o fluido aislado de un sujeto que normalmente incluye anticuerpos producidos por el sujeto. Las muestras típicas que incluyen dichos anticuerpos se conocen en la técnica e incluyen, entre otras, sangre, plasma, suero, material fecal, orina, médula ósea, bilis, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, muestras de la piel, secreciones externas de la piel, los tractos respiratorio, intestinal y ginecario, muestras derivadas del epitelio gástrico y la mucosa gástrica, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, órganos, biopsias, así como muestras de constituyentes de cultivos celulares in vitro, incluidos, entre otros, medios acondicionados resultantes del crecimiento de células y tejidos en medio de cultivo, por ejemplo células recombinantes y componentes celulares.

“Soporte sólido común” quiere decir una matriz sólida sencilla a la que los polipéptidos del VHC usados en los inmunoensayos objeto están unidos covalentemente o por medios no covalentes, tales como adsorción hidrófoba.

“Inmunológicamente reactivo” o “inmunorreactivo” quiere decir que el antígeno en cuestión reacciona específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC.

“Inmunogénico” quiere decir que el antígeno en cuestión producirá una reacción inmunitaria cuando se administre a un individuo.

“Complejo inmunitario” quiere decir la combinación formada cuando un anticuerpo se une a un epítopo sobre un antígeno.

Como se usa en el presente documento, los términos “marcador” y “marcador detectable” se refieren a una molécula capaz de realzar detección, incluidas, entre otras, isótopos radioactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores de enzimas, inhibidores de enzimas, cromóforos, colorantes, iones

metálicos, solamente metálicos, ligandos (p. ej., biotina, avidina, estreptavidina o haptenos) y similares. El término “fluorescente” se refiere a una sustancia o porción de la sustancia que es capaz de exhibir fluorescencia en la gama detectable. Ejemplos concretos de marcadores que se pueden usar con la invención incluyen, entre otros, peroxidasa de rábano (HRP), fluoresceína, FITC, rodamina, dansilo, umbeliferona, éster de dimetilacridinio (DMAE), rojo Texas, NADPH,  $\alpha$ - $\beta$ -galactosidasa.

## II. Modos de llevar a cabo la invención

Antes de describir con detalle la presente invención debe entenderse que la presente invención no se limita a formulaciones concretas o parámetros de procedimientos concretos, ya que todos pueden, por supuesto, variar. Se entenderá también que la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir sólo realizaciones particulares de la invención y no se desea que sea limitante.

Aunque en la práctica de la presente invención se pueden usar numerosas composiciones y procedimientos similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los procedimientos y materiales preferidos.

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención se basa en el descubrimiento de que los mutantes de polipéptidos del VHC con dominios de NS3 modificados, de modo que esté inhibida la actividad proteolítica de la proteasa NS3, pueden conservar los epítomos conformacionales y, por tanto, son útiles en inmunoensayos para detectar la presencia de infección por VHC. Los mutantes de NS3 son especialmente útiles en procedimientos diagnósticos para detección precisa y precoz de la infección por VHC. Los procedimientos se pueden usar para detectar infección por VHC durante las primeras etapas de la seroconversión del VHC, incrementando de este modo la precisión de la detección y reduciendo la incidencia de resultados falsos.

En particular, los inmunoensayos descritos en el presente documento usan epítomos altamente inmunorreactivos derivados de la región NS3/4a de la poliproteína del VHC con mutaciones que alteran la actividad proteolítica pero conservan los epítomos conformacionales. Los polipéptidos de NS3 modificados se pueden usar solos en inmunoensayos o en combinación con otros antígenos del VHC, tales como antígenos de fusión de múltiples epítomos que comprenden varios polipéptidos del VHC, bien de los mismos o de diferentes genotipos y aislamientos del VHC, tal como múltiples epítomos inmunodominantes, por ejemplo epítomos lineales principales del núcleo del VHC, SECUENCIAS E1, E2, NS3, NS4, 5-1-1, c100-3 y NS5. Los procedimientos se pueden poner en práctica de forma conveniente en un ensayo sencillo usando cualquiera de los diversos formatos de ensayo que se describen más adelante, tales como, entre otros, formatos de ensayos que usan un soporte sólido al que se unen los antígenos del VHC.

Con el fin de entender adicionalmente la invención se proporciona una discusión más detallada con respecto a polipéptidos de NS3 modificados y fusiones del VHC (es decir, MEF A), así como producción de las proteínas y procedimientos de usar las proteínas.

### Proteínas del VHC

Los genes de las cepas del VHC contienen un único marco de lectura abierto de aproximadamente 9.000 a 12.000 nucleótidos que se transcriben en una poliproteína. Como se muestra en la Figura 1 y la Tabla 1, una poliproteína del VHC, tras escisión, produce al menos diez productos distintos, en el orden siguiente:

NH<sub>2</sub>-Núcleo-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. El polipéptido del núcleo se produce en las posiciones 1-191, numerados en relación con el VHC-1 (véase, Choo y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455, para el genoma del VHC-1). Este polipéptido se procesa después para producir un polipéptido del VHC con aproximadamente 1-173 aminoácidos. Los polipéptidos de la cubierta, E1 y E2, se producen aproximadamente en las posiciones 192-383 y 384-746, respectivamente. El dominio P7 se encuentra aproximadamente en las posiciones 747-809. NS2 es una proteína integral de la membrana con actividad proteolítica y se encuentra aproximadamente en las posiciones 810-1026 de la poliproteína. NS2, en combinación con NS3, (encontrada aproximadamente en las posiciones 1027-1657), escinde el enlace Scissile NS2-NS3 que, a su vez, genera el extremo NS3 N y libera una poliproteína grande que incluye las actividades serina proteasa y ARN helicasa. La proteasa NS3, que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1027-1207, sirve para procesar el resto de la poliproteína. La actividad helicasa se encuentra alrededor de las posiciones 1193-1657. NS3 libera un cofactor de NS3 (NS4a, que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1658-1711), dos proteínas (NS4b, que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1712-1972, y NS5a que se encuentra aproximadamente en las posiciones 1973-2420), y una ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5b, que se encuentra aproximadamente en las posiciones 2421-3011). La terminación de la maduración de la poliproteína se inicia mediante escisión autocatalítica en la unión NS3-NS4a, catalizada por la NS3 serina proteasa.

| Tabla 1    |                      |
|------------|----------------------|
| Dominio    | Límites aproximados* |
| C (núcleo) | 1-191                |
| E1         | 192-383              |
| E2         | 384-746              |
| P7         | 747-809              |
| NS2        | 810-1026             |
| NS3        | 1027-1657            |
| NS4a       | 1658-1711            |
| NS4b       | 1712-1972            |
| NS5a       | 1973-2420            |
| NS5b       | 2421-3011            |

\*Numerado con respecto al VHC-1. Véase Choo y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455.

Los polipéptidos de NS3 modificados de la invención están mutados para inhibir la actividad proteasa, de modo que la escisión adicional un polipéptido que incluye el dominio NS3 modificado, tal como un polipéptido NS3/4a, así como la escisión catalítica de proteínas del VHC adicionales usadas en combinación con el polipéptido de NS3 modificado, está inhibida. El polipéptido NS3 se puede modificar mediante delección de todo o una porción del dominio de proteasa NS3. Como alterativa, la actividad proteolítica se puede inhibir mediante sustitución de aminoácidos dentro de las regiones activas del dominio proteasa. Por último, las adiciones de aminoácidos a las regiones activas del dominio, de modo que se modifica el sitio catalítico, también servirán para inhibir la actividad proteolítica. Preferentemente, las modificaciones realizadas para reducir o eliminar la actividad proteasa no alteran los epítomos conformacionales en las proteínas NS3 o NS3/4a nativas.

Como se ha explicado anteriormente, la actividad proteasa se encuentra en aproximadamente las posiciones 1027-1207, numeradas con respecto a la poliproteína del VHC-1 de longitud completa (véase, Choo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2451-2455), las posiciones 2-182 de la Figura 3. Se conocen la estructura de la proteasa NS3 y un sitio activo. Véase, por ejemplo, De Francesco y col., Antivir. Ther. (1998) 3:99-109; Koch y col., Biochemistry (2001) 40:631-640. Por tanto, las delecciones o modificaciones de la secuencia nativa normalmente se producirán en o cerca del sitio activo de la molécula. Particularmente, es deseable modificar o realizar delecciones de uno o más aminoácidos que se producen en las posiciones 1 o 2-182, preferentemente 1 o 2-172 o 1 o 2-155 de la figura 3. Las modificaciones preferidas se realizan en la tríada catalítica en el sitio activo de la proteasa, es decir los residuos H, D y/o S, con el fin de inactivar la proteasa. Estos residuos se producen en las posiciones 1083, 1105 and 1165, respectivamente, numeradas respecto a la poliproteína de longitud completa del VHC (posiciones 58, 80 y 140, 1083, 1105 and 1165, respectivamente, de la Figura 3. Dichas modificaciones suprimirán la actividad de escisión proteolítica de la proteasa NS3 al tiempo que mantienen la inmunoreactividad. Sustituciones particularmente preferidas son de naturaleza no conservadora, tal como una sustitución de Ala para uno o más de los residuos de aminoácidos que normalmente se encuentran en las posiciones 1083, 1105 y 1165 del dominio proteasa. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente las porciones de la proteasa NS3 que se van a eliminar con el fin de alterar la actividad.

Además, un experto en la técnica puede determinar fácilmente otras modificaciones de aminoácidos adecuadas en estos sitios en base a la estructura y función conocidas de la proteasa NS3 del VHC como se describe en, por ejemplo, De Francesco y col., Antivir. Ther. (1998) (Supl. 3): 99-109; y Schechter y Berger, Biochim. Biophys. Res. Commun. (1967) 27:157-162. En particular, se sabe que la proteasa NS2 es una serina proteasa y el mecanismo proteolítico se basa en el ataque nucleofílico del enlace peptídico objetivo mediante una serina. En muchos casos, la propiedad nucleofílica del grupo mejor con la presencia de una histidina, mantenida en un "estado aceptor de protones" por un aspartato. Las cadenas laterales alineadas de serina, histidina y aspartato forman la tríada analítica común a la mayoría de las serina proteasas. El sitio activo de las serina proteasas tiene forma de hendidura en la que se une el sustrato polipeptídico. Schechter y Berger, Biochim. Biophys. Res. Commun. (1967) 27:157-162 marcaron los residuos de aminoácidos desde el extremo N al C del sustrato polipeptídico (Pi, ..., P3, P2, P1, P1', P2', P3', ..., Pj) y sus subsitios de unión respectivos (Si, ..., S3, S2, S1, S1', S2', S3', ..., Sj) y descubrieron que la

escisión se cat aliza entre P1 y P1'. La NS3 proteasa adopta un pl iegue similar al d e la quimotripsina e incluye un sitio muy largo de unión al sustrajo expuesto al d isolvente, consistente con el requisito de sustratos peptídicos muy largos (P6-P4'). La proteasa NS3 tiene preferencia por los residuos de cisteína en la posición del sustrato P1. Por tanto, en base a la estructura y función conocidas como se ha descrito anteriormente y en la técnica, un experto en la técnica puede determinar fácilmente otras sustituciones, adiciones y delecciones de aminoácidos que servirán para romper la actividad proteolítica de la proteasa NS3.

La presencia o ausencia de la actividad proteolítica de NS3 se puede determinar usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la actividad proteasa, o ausencia de la misma, se puede determinar usando el procedimiento que se describe más adelante en los ejemplos, además de usar ensayos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Takeshita y col., *Anal. Biochem.* (1997) 247:242-246; Kakiuchi y col., *J. Biochem.* (1997) 122:749-755; Sali y col., *Biochemistry* (1998) 37:3392,3401-3401; Cho y col., *J. Virol. Meth.* (1998) 72:109-115; Cerretani y col., *Anal. Biochem.* (1999) 266:192-197; Zhang y col., *Anal. Biochem.* (1999) 270:268-275; 268-275; Kakiuchi y col., *J. Virol. Meth.* (1999) 80:77-84; Fowler y col., *J. Biomol. Screen.* (2000) 5:153-158; y Kim y col., *Anal. Biochem.* (2000) 284:42-48.

En la molécula NS3 también puede haber mutaciones adicionales, pero no tienen que estar, tales como mutaciones en el dominio helicasa, por ejemplo la sustitución de uno o ambos residuos de aminoácidos encontrados en las posiciones 1428 y 1429, tal como Pro y Thr normalmente presentes en la posición 1428 e Ile por Ser normalmente presente en la posición 1429. Estas mutaciones se denominan mutantes "PI" en el presente documento. La figura 4B muestra una construcción NS3 modificada representativa. La proteína incluye una Met en N-terminal y los aminoácidos 1027-1657 de NS3 y, por tanto, incluye los dominios NS3 de longitud completa de la poliproteína del VHC. La Ser que normalmente está presente en la posición 1165 está sustituida con Ala. Además, el mutante incluye la sustitución PI descrita anteriormente. Las secuencias de ADN y de aminoácidos de esta construcción se representan en las Figuras 6A-6C.

Los polipéptidos NS3 modificados de la presente invención también pueden incluir, además de un dominio proteasa NS3 modificada, el dominio helicasa de NS3 (es decir, toda la secuencia polipeptídica de NS3 y/o uno o más polipéptidos de una o más otras regiones de una poliproteína del VHC. Preferentemente, los polipéptidos NS3 modificados incluirán el polipéptido NS4a o un fragmento del mismo. De hecho, todas las regiones de la poliproteína del VHC pueden estar presentes en dichas fusiones. Estos polipéptidos pueden derivar del mismo aislamiento del VHC como el polipéptido NS3 o de diferentes cepas y aislamientos, incluidos los aislamientos que tienen cualquiera de los diversos genotipos del VHC, para proporcionar mayor protección contra un amplio abanico de genotipos del VHC. Adicionalmente, los polipéptidos se pueden seleccionar en base a los clados virales concretos endémicos de regiones geográficas específicas en las que se usarán los inmunoanalíticos. Es fácilmente evidente que las proteínas modificadas del VHC proporcionan un modo eficaz de diagnosticar la infección por VHC en una amplia variedad de contextos.

Se han determinado las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de una serie de cepas y aislamientos de VHC, incluidas las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de las diversas regiones de la poliproteína del VHC, incluidos los genes y polipéptidos del núcleo, NS2, p7, E1, E2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b. Por ejemplo, el aislamiento J1.1 del VHC se describe en Kubo y col. (1989) *Japan. Nucl. Acids Res.* 17:10367-10372; Takeuchi y col., (1990) *Gene* 91:287-291; Takeuchi y col. (1990) *J. Gen. virol.* 71: 3027-3033; y Takeuchi y col., (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:4626. Las secuencias codificadoras completas de dos aislamientos independientes, HCV-J y BK, se describen en Kato y col., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9524-9528 y Takamizawa y col., (1991) *J. Virol.* 65:1105-1113 respectivamente.

Las publicaciones que describen los aislamientos del VHC-1 incluyen Choo y col. (1990) *Brit. Med. Bull.* 46:423-441; Choo y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2451-2455 y Han y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1711-1715. Los aislamientos del VHC HC-J1 y HC-J4 se describen en Okamoto y col. (1991) *Japan J. Exp. Med* 60:167-177. Los aislamientos del VHC HCT 18~, HCT 23, HCT 27, EC1 y EC10 se describen en Weiner y col. (1991) *Virol.* 180:842-848. Los aislamientos del VHC Pt-1, HCV-K1 y HCV-K2 se describen en Okamoto y col. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170:1021-1025. Los aislamientos del VHC A, C, D y E se describen en Tsukiyama-Kohara y col. (1991) *Virus Genes* 5:243-254.

Cada uno de los componentes de una proteína de fusión se puede obtener de la misma cepa o aislamiento del VHC o de diferentes cepas o aislamientos del VHC. Por ejemplo, el polipéptido de NS3 modificado se puede obtener de una primera cepa de VHC y otros polipéptidos de VHC presentes se pueden obtener de una segunda cepa de VHC. Como alternativa, uno o más de los otros polipéptidos del VHC, por ejemplo NS2, NS4a, NS4b, Núcleo, p7, E1 y/o E2, so están presentes, se puede obtener de una primera cepa de VHC y el resto de los polipéptidos de VHC se pueden obtener de una segunda cepa de VHC. Adicionalmente, cada uno de los polipéptidos de VHC presentes se puede obtener de diferentes cepas de VHC.

En ciertas realizaciones, la proteína NS3 modificada también comprende un dominio NS4a, o una porción del mismo, por ejemplo un dominio NS4a y/o un NS4b, o un fragmento del mismo. La proteína NS3 modificada (con o sin el dominio NS4a) también se puede fusionar con otras regiones del VHC, tal como con un dominio NS5a, un polipéptido del núcleo de un VHC, y similares. Estas regiones no tienen que estar en el orden en el que están de

forma natural en la poliproteína nativa del VHC. Por tanto, por ejemplo, si está presente, el polipéptido NS4a se puede fusionar con el extremo C y/o C del polipéptido NS3.

Las Figuras 4A y 4C muestran polipéptidos NS3 modificados representativos. En las Figuras, la Ser normalmente presente en la posición 1165 está sustituida por Ala. Adicionalmente, los mutantes incluyen la sustitución PI descrita anteriormente, es decir una sustitución de Pro por Thr normalmente presente en la posición 1428 e Ile por la Ser normalmente presente en la posición 429. En la Figura 4A, la proteína incluye en dirección N-terminal a C-terminal, una Met en N-terminal y los aminoácidos 1027-1657 de NS3 y los aminoácidos 1658-1711 de NS4a. Por tanto, esta fusión incluye los dominios NS3 y NS4a de longitud completa de la poliproteína del VHC. La secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos de la proteína se muestran en las Figuras 5A-5C. En la Figura 4C, la proteína incluye en dirección N-terminal a C-terminal, una Met en N-terminal y los aminoácidos 1678-1690 de NS4a, seguida de la secuencia de aminoácidos SGS, después los aminoácidos 1029 a 1657 de NS3. Por tanto, esta fusión incluye 13 aminoácidos del dominio NS4a, seguido de una secuencia ligadora flexible tripeptídica (denominada una secuencia de "giro") y, después, casi todo el dominio NS3 (excepto los dos primeros aminoácidos en N-terminal). La secuencia de giro permite que NS4a se pliegue en el bolsillo dentro de la proteasa. La secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos de la proteína se muestran en las Figuras 7A-7C. La numeración del presente documento hace referencia a la poliproteína de longitud completa del VHC-1 y se determinan con facilidad regiones equivalentes en otros serotipos del VHC.

Los polipéptidos NS3 modificados descritos con anterioridad se pueden usar en inmunoensayos con antígenos de fusión de múltiples epítomos (denominados "MEFA"), como se ha descrito en la publicación internacional nº WO 97/44469 y las patentes de EE.UU. nº 6.514.731 y 6.428.792. Dichos MEFA incluyen múltiples epítomos de dos o más de las diversas regiones virales de la poliproteína del VHC mostradas en la Figura 1 y la Tabla 1, y como se ha descrito con detalle más adelante. El uso de dichos polipéptidos NS3 modificados con los MEFA garantiza que no se producirá la escisión proteolítica de NS3 proteasa, de modo que se proporcionan mejores reactivos para usar en inmunoensayos del VHC.

Los múltiples antígenos del VHC están dispuestos como una única cadena continua de aminoácidos, cadena que no se produce como tal en la naturaleza. Por tanto, el orden lineal de los epítomos es diferente de su orden lineal en el genoma en el que se producen. El orden lineal de las secuencias de los MEFA para uso en el presente documento se dispone, preferentemente, para antigenicidad óptima. Preferentemente, los epítomos proceden de más de una cepa del VHC, de modo que proporcionan la capacidad añadida de detectar múltiples cepas del VHC en un único ensayo. Por tanto, los MEFA para usar en el presente documento pueden comprender diversas regiones inmunogénicas derivadas de la poliproteína descrita anteriormente. Además, se puede usar una proteína resultante de un cambio de marco de lectura en la región central de la poliproteína, tal como se describe en la publicación internacional nº WO 99/63941, en los MEFA o fusiones con la NS3 modificada descrita anteriormente. Si se desea, en la proteína de fusión se pueden producir al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más de uno o más epítomos derivados de la poliproteína del VHC.

Epítomos del VHC adicionales para uso en los MEFA incluyen epítomos derivados de la región hipervariable de E2, tal como una región que abraza los aminoácidos 384-414 o 390-410, o la secuencia consenso de esta región, Gly-Ser-Ala-Ala-Arg-Thr-Thr-Ser-Gly-Phe-Val-Ser-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Gln-Asn (SEC ID Nº 11), que representa una secuencia consenso para los aminoácidos 390-410 del genoma del VHC de tipo 1. Un epítopo de E2 representativo en un MEFA de la invención puede comprender un epítopo híbrido que abarca los aminoácidos 384-414. Dicho epítopo de E2 híbrido puede incluir una secuencia consenso que representa los aminoácidos 390-410 condensados a una secuencia consenso de una segunda cepa. Como alternativa, el epítopo de E2 presente puede comprender un epítopo híbrido que abarca los aminoácidos 390-444. Dicho epítopo de E2 híbrido puede incluir una secuencia consenso que representa los aminoácidos 390-410 como se ha detallado anteriormente condensada, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos nativa para los aminoácidos 411-444 para E2 del VHC.

Adicionalmente, los antígenos pueden derivar de varias cepas del VHC. Se conocen múltiples cepas virales del VHC y se pueden usar los epítomos derivados de cualquiera de estas cepas en una proteína de fusión. Se sabe bien que cualquier especie de organismo dada varía de un organismo individual a otro y, además, que un organismo dado, tal como un virus, puede tener una serie de cepas diferentes. Por ejemplo, como se ha explicado anteriormente, el VHC incluye al menos 6 genotipos. Cada uno de estos genotipos incluye determinantes antigénicos equivalentes. Más específicamente, cada cepa incluye una serie de determinantes antigénicos que están presentes en todas las cepas del virus, pero que son ligeramente diferentes de una cepa viral a otra. Por ejemplo, el VHC incluye el determinante antigénico conocido como 5'-1-1 (véase la Figura 1). El epítopo 5'-1-1 se encuentra en aproximadamente las posiciones 1694-1735, numeradas con respecto a la secuencia de la poliproteína del VHC-1. Este determinante antigénico concreto aparece en tres formas diferentes en VHC-1, VHC-2 y VHC-3. De acuerdo con esto, en una realización preferida de la invención, las tres formas de 5'-1-1 aparecen en el antígeno de fusión de múltiples epítomos usado en los inmunoensayos objeto. De forma similar, puede también haber determinantes antigénicos equivalentes de la región del núcleo de diferentes cepas de VHC. En general, los determinantes antigénicos equivalentes tienen un grado alto de homología en términos de secuencia de aminoácidos cuyo grado de homología es, en general, 30 % o más, preferentemente 40 % o más, cuando están alineados. El epítopo de múltiples copias de la presente invención también puede incluir múltiples copias que son copias exactas del mismo epítopo.

Las Figuras 8 y 11A-11C muestran MEFA representativas para usar en la presente invención que derivan del VHC. No obstante, debe entenderse que otros epítomos derivados del genoma del VHC también encontrarán utilidad en los presentes ensayos.

La secuencia de ADN y la correspondiente secuencia de aminoácidos de un antígeno de fusión de múltiples epítomos representativos, MEFA 7.1 se muestra en las Figuras 9A-9F. Este MEFA también se describe en la patente de EE.UU. n° 6.632.601. La fórmula estructural general de MEFA 7.1 se muestra en la Figura 8 y es la siguiente: hSOD-E1(tipo 1)-E2 HVR consenso (tipo 1 a)-E2 HVR consenso (tipos 1 y 2)-helicasa (tipo 1)-5-1-1 (tipo 1)-5-1-1 mutado (tipo 3)-5-1-1 (tipo 2)-c100(tipo 1)-NS5(tipo 1)-NS5(tipo 1)-núcleo (tipos 1+2)-núcleo (tipos 1+2). Este epítomo de múltiples copias incluye la siguiente secuencia de aminoácidos, numerada con respecto al VHC-1 (la numeración de los aminoácidos que se indica a continuación sigue la designación de numeración proporcionada en Choo y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:24 51-2455, en la que el aminoácido n° 1 es la primera metionina codificada por la secuencia de codificación de la región del núcleo): los aminoácidos 1-156 de la superóxido dismutasa (SOD, usada para potenciar la expresión recombinante de la proteína), los aminoácidos 303 a 320 de la poliproteína de la región E1; los aminoácidos 390 a 410 de la poliproteína, que representan una secuencia consenso para la región hipervariable del VHC-1aE2; los aminoácidos 384 a 414 de la poliproteína de la región E2, que representan una secuencia consenso para las regiones hipervariables E2 del VHC-1 y VHC-2; los aminoácidos 1193-1658 de la poliproteína del VHC-1 que define la helicasa; tres copias de un epítomo de 5-1-1, los aminoácidos 1689-1735, uno del VHC-1, uno del VHC-3 y uno del VHC-2, copias que son determinantes antigénicos equivalentes de las tres cepas virales diferentes del VHC; el polipéptido C100 del VHC del VHC-1, los aminoácidos 1901-1936 de la poliproteína; dos copias exactas de un epítomo de la región NS5 del VHC-1, cada una con los aminoácidos 2278 a 2313 de la poliproteína del VHC; y dos copias exactas de un epítomo de la región del núcleo, una del VHC-1 y una del VHC-2, copias que son determinantes antigénicos equivalentes representados por los aminoácidos 9 a 32, 39-42 y 64-88 del VHC-1 y 67-84 del VHC2.

La Tabla 2 muestra las posiciones de los aminoácidos de los diversos epítomos con referencia a las Figuras 9A-9F en el presente documento.

| Tabla 2. MEFA 7.1 |                     |                     |              |      |
|-------------------|---------------------|---------------------|--------------|------|
| MEFA n° aa        | Sitio en extremo 5' | epítomo             | VHC n° aa    | Cepa |
| 1-156             | Nco1                | hSOD                |              |      |
| 159-176           | EcoR1               | E1                  | 303-320      | 1    |
| 179-199           | Hind111             | E2 HVR1 consenso    | 390-410      | 1    |
| 200-230           |                     | E2 HVR1 +2 consenso | 384-414      | 1+2  |
| 231-696           | Sal1                | Helicasa            | 1193-1658    | 1    |
| 699-745           | Sph1                | 5-1-1               | 1689-1735    | 1    |
| 748-794           | Nru1                | 5-1-1               | 1689-1735    | 3    |
| 797-843           | Cla1                | 5-1-1               | 1689-1735    | 2    |
| 846-881           | Ava1                | C100                | 1901-1936    | 1    |
| 884-919           | Xba1                | NS5                 | 2278-2313    | 1    |
| 922-957           | Bgl1                | NS5                 | 2278-2313    | 1    |
| 958-1028          | Nco1                | Epítomos del núcleo | 9-32, 39-42  | 1    |
|                   |                     |                     | 64-88        | 1    |
|                   |                     |                     | 67-84        | 2    |
| 1029-1099         | Bam1                | Epítomos del núcleo | 9-32, 39-42, | 1    |
|                   |                     |                     | 64-88        | 1    |
|                   |                     |                     | 67-84        | 2    |

En una realización de la invención, representada en la Figura 2, se realiza un inmunoensayo de captura rápida usando un polipéptido NS3 modificado, o fusión que incluye un polipéptido NS3 modificado y uno o más antígenos de fusión de múltiples epítomos, tales como MEFA 7.1. La muestra se combina con los antígenos que pueden estar presentes sobre un soporte sólido, como se describe adicionalmente más adelante. Si la muestra está infectada por VHC, los anticuerpos anti-VHC frente a dichos epítomos presentes sobre el soporte sólido se unirán a los componentes de soporte sólido. La detección se realiza mediante la fijación de un marcador detectable (tal como peroxidasa de rábano (HRP) como se muestra en la Figura 2) a un miembro del complejo antígeno/anticuerpo. La fijación se puede realizar por medios covalentes o mediante la posterior unión de anticuerpos marcados de forma detectable, tales como en un ensayo de tipo sándwich estándar, O mediante reacción enzimática cuyo producto es detectable. El marcador detectable puede incluir, entre otros, un cromóforo, un anticuerpo, un antígeno, una enzima, un compuesto reactivo a la enzima cuyo producto de escisión es detectable, rodamina o derivado de rodamina, biotina, avidina, estreptavidina, un compuesto fluor escente, un compuesto quimioluminiscente, tal como éster de dimetilacridinio (DMAE), derivados y/o combinaciones de estos marcadores. Convenientemente se puede usar un anticuerpo anti-humano marcado de forma detectable, capaz de detectar una molécula de IgG humana presente.

#### Producción de antígenos del VHC

Como se ha explicado anteriormente, las moléculas de la presente invención se producen, en general, de forma recombinante. Por tanto, los polinucleótidos que codifican antígenos del VHC para usar con la presente invención se pueden fabricar usando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, las secuencias polinucleotídicas que codifican las moléculas descritas anteriormente se pueden obtener usando procedimientos recombinantes, tales como mediante detección selectiva de bibliotecas de ADNc y genómicas de células que expresan el gen o derivando el gen de un vector que se sabe que las incluye. Además, el gen deseado se puede aislar directamente de moléculas de ácido nucleico viral usando técnicas descritas en la técnica, tal como en Houghton y col., la patente de EE.UU. nº 5.350.671. El gen de interés también se puede producir sintéticamente en lugar de clonarse. Las moléculas se pueden diseñar con los codones adecuados para la secuencia concreta. Después, la secuencia completa se ensambla a partir de oligonucleótidos solapados preparados mediante procedimientos convencionales y reunidos en una secuencia codificadora completa. Véase, por ejemplo, Edge (1981) Nature 292:756; Nambair y col. (1984) Science 223:1299; y Jay y col. (1984) J. Biol. Chem. 259:6311.

Por tanto, se pueden obtener secuencias nucleotídicas concretas de vectores que alojan las secuencias deseadas o se pueden sintetizar completamente o en parte usando diversas técnicas de síntesis de oligonucleótidos conocidas en la técnica, tal como las técnicas de mutagénesis dirigida al sitio y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuando sea adecuado. Véase, por ejemplo, Sambrook, ant. En particular, un procedimiento de obtener secuencias nucleotídicas que codifican las secuencias deseadas es mediante hibridación de conjuntos complementarios de oligonucleótidos sintéticos solapantes producidos en un sintetizador automático convencional de nucleótidos, seguido de unión con una ADN ligasa adecuada y amplificación de la secuencia de nucleótidos ligada mediante PCR. Véase, por ejemplo, Jayaraman, y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4084-4088. Adicionalmente, se pueden usar síntesis dirigida a oligonucleótidos (Jones y col. (1986) Nature 54:75-82), mutagénesis dirigida a oligonucleótidos de regiones nucleotídicas preexistentes (Riechmann y col. (1988) Nature 332:323-327 y Verhoeven y col. (1988) Science 239:1534-1536), y llenado enzimático de huecos de oligonucleótidos usando la ADN polimerasa de T4 (Queen y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033) en la invención para proporcionar moléculas que tienen alteradas o potenciadas las capacidades de unión a antígeno o reducida la inmunogenicidad.

Los procedimientos para producir mutantes o análogos de la secuencia de nucleótidos deseada, tal como NS3 u otros antígenos del VHC, son bien conocidos. Véase, por ejemplo, DasMahapatra y col., la patente de EE.UU. nº 5.843.752, y Zhang y col., la patente de EE.UU. nº 5.990.276. Los mutantes o análogos de NS3 y otras proteínas del VHC para usar en inmunoensayos pueden prepararse mediante la delección de una porción de la secuencia que codifica el polipéptido de interés, mediante inserción de una secuencia y/o mediante sustitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas para modificar las secuencias de nucleótidos, tales como mutagénesis dirigida al sitio y similares. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., ant.; Kunkel, T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:448; Geisselsoder y col. (1987) BioTechniques 5:786; Zoller y Smith (1983) Methods Enzymol. 100:468; Dalbie-McFarland y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6409.

Una vez que se han preparado o aislado las secuencias codificadoras, dichas secuencias se pueden clonar en cualquier vector adecuado o replicón. Los expertos en la técnica conocen numerosos vectores de clonación y la selección de un vector de clonación adecuado es cuestión de elección. Vectores adecuados incluyen, entre otros, plásmidos, fagos, transposones, cósmicos, cromosomas o virus, que son capaces de replicarse cuando están asociados con los elementos de control adecuados.

Después, la secuencia de codificación se introduce bajo el control de elementos de control adecuados en función del sistema que se va a usar para la expresión. Por tanto, la secuencia de codificación se puede introducir bajo el control de un promotor, sitio de unión al ribosoma (para expresión bacteriana) y, opcionalmente, un operador, de modo que la secuencia de ADN de interés se transcribe en ARN mediante un transformante adecuado. La secuencia

codificadora puede o no contener un péptido señal o secuencia líder que después puede eliminarse mediante el procesamiento postraduccional del huésped. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 4,431,739; 4,425,437; 4,338,397.

Además de las secuencias control, puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión de las secuencias respecto al crecimiento de la célula huésped. Las secuencias reguladoras son conocidas para el experto en la técnica y entre los ejemplos se incluyen aquéllos que causan la expresión de un gen que se encenderá o apagará en respuesta a un estímulo químico o físico, incluida la presencia de un compuesto regulador. Otros tipos de elementos reguladores también pueden estar presentes en el vector. Por ejemplo, en el presente documento se pueden usar elementos potenciadores para incrementar los niveles de expresión de las construcciones. Ejemplos incluyen el potenciador del gen temprano de SV40 (Dijkema y col. (1985) EMBO J. 4:761), el potenciador/promotor derivado de la repetición larga terminal (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Gorman y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777) y elementos derivados del CMV humano (Boshart y col. (1985) Cell 41:521), tales como los elementos incluidos en la secuencia del intrón A del CMV (patente de EE.UU. nº 5.688.688). El casete de expresión puede incluir además un origen de replicación para la replicación autónoma en una célula huésped adecuada, uno o más marcadores seleccionables, uno o más sitios de restricción, un potencial para un número de copias altas y un promotor fuerte.

Se construye un vector de expresión de modo que la secuencia codificadora concreta se localiza en el vector con las secuencias reguladoras adecuadas, siendo la posición y orientación de la secuencia codificadora con respecto a las secuencias control tales que la secuencia codificadora se transcribe bajo el "control" de las secuencias control (es decir, la ARN polimerasa que se une a la molécula de ADN en las secuencias control transcribe la secuencia codificadora). La modificación de las secuencias que codifican la molécula de interés puede ser deseable para conseguir este extremo. Por ejemplo, en algunos casos, puede ser necesario modificar la secuencia codificadora de modo que pueda unirse a las secuencias control con la orientación adecuada; es decir, para mantener el marco de lectura. Las secuencias control y otras secuencias reguladoras pueden unirse a la secuencia codificadora antes de la inserción en un vector. Como alternativa, la secuencia codificadora se puede clonar directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias control y un sitio de restricción adecuado.

Las moléculas se pueden expresar en una amplia variedad de sistemas, incluidos sistemas de expresión de insectos, mamíferos, bacterias, virus y levaduras, todos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los sistemas de expresión en células de insectos, tales como los sistemas de baculovirus, son conocidos para el experto en la técnica y se describen en, por ejemplo, Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987). Materiales y procedimientos para los sistemas de expresión en células de insecto/baculovirus están disponibles comercialmente en forma de kit de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA (kit "MaxBac"). De forma similar, los sistemas de expresión en bacterias y células de mamífero son bien conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Sambrook y col., ant. Los sistemas de expresión en levaduras también se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Yeast Genetic Engineering (Barr y col., eds., 1989) Butterworths, London..

También se conocen una serie de células huésped adecuadas con los sistemas anteriores. Por ejemplo, en la técnica se conocen líneas celulares de mamífero e incluyen líneas de células inmortalizadas disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), tales como, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células HELa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de riñón embrionario humano, células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), células de riñón bovino de MADin-Darby ("MDBK"), además de otras. De igual forma, con los presentes constructos de expresión pueden encontrarse utilidades huéspedes bacterianos tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus* spp. Las células huésped de levaduras útiles en la presente invención incluyen, entre otras, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Entre las células de insecto para usar con los vectores de expresión de baculovirus se incluyen *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*.

Las moléculas de ácido nucleico que comprenden las secuencias de nucleótidos de interés se pueden integrar de forma estable en el genoma de una célula huésped o se pueden mantener en un elemento episomal estable en una célula huésped adecuada usando varias técnicas de liberación génica bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.399.346.

Según el sistema de expresión y el huésped seleccionado, las moléculas son producidas por células huésped en crecimiento transformadas por un vector de expresión descrito en lo que antecede en las condiciones en las que se expresa la proteína. La proteína expresada se aísla después en la célula huésped y se purifica. Si el sistema de expresión secreta la proteína en el medio de crecimiento, el producto se puede purificar directamente del medio. Si no se secreta, se puede aislar de lisados celulares. La selección de las condiciones de crecimiento adecuadas y los procedimientos de recuperación están dentro de la experiencia en la técnica.

Se ha descrito la producción recombinante de varios antígenos del VHC, incluidos antígenos usados en las diversas fusiones descritas anteriormente. Véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales nº WO 94/01778, WO 93/00365, WO 04/00547 y WO 01/38360; las patentes de EE. UU. nº 5.350.671, 5.683.864, 6.346.375, 6.150.087,

6.514.731, 6.428.792 y 6.632.601; Chien y col., J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chien, D.Y., publicación internacional nº WO 94/01778; Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015. Un procedimiento preferido de producir polipéptidos de NS3 modificados se describe en el Ejemplo 1.

#### Ensayos inmunodiagnósticos

- 5 Una vez que se han producido, los antígenos del VHC pueden usarse en casi cualquier formato de ensayo que usa un antígeno conocido para detectar anticuerpos. Una característica común a todos estos ensayos es que el antígeno se pone en contacto con el componente del cuerpo del que se sospecha que contiene anticuerpos anti-VHC en condiciones que permitan que el antígeno se una a cualquier anticuerpo presente en el componente. Dichas condiciones normalmente serán la temperatura fisiológica, pH y fuerza iónica usando un exceso de antígeno. A la
- 10 incubación del antígeno con la muestra le sigue la detección de complejos inmunitarios formados con el antígeno.

- El diseño de los inmunoensayos está sujeto a una gran cantidad de variaciones y en la técnica se conocen muchos formatos. Por ejemplo, los formatos pueden usar soportes sólidos o inmunoprecipitación. La mayoría de los ensayos implican el uso de anticuerpos o polipéptidos marcados; los marcadores pueden ser, por ejemplo, moléculas enzimáticas, fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivos o colorantes, como se trata con detalle anteriormente.
- 15 También se conocen ensayos amplifican las señales del complejo inmunitarios, ejemplos de los cuales son los ensayos que usan biotina y avidina, e inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tales como ensayos ELISA.

- El inmunoensayo puede ser, sin limitaciones, un formato heterogéneo u homogéneo, y de un tipo convencional o competitivo. En un formato heterogéneo, normalmente el polipéptido se une a una matriz o soporte sólido para facilitar la separación de la muestra del polipéptido tras la incubación. Para los fines de la presente invención, un soporte sólido puede ser cualquier material que sea una matriz insoluble y puede tener una superficie rígida o semirígida. Ejemplos de soportes sólidos incluyen, entre otros, sustratos tales como nitrocelulosa (p. ej., en forma de membrana o pocillos de microtitulación; polivinilcloruro (p. ej., láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (p. ej., perlas o placas de microtitulación) fluoruro de polivinilideno; papel diazotizado; membranas de
- 20 nylon; perlas activadas, perlas respondedoras magnéticamente, y similares. Soportes concretos incluyen placas, pastillas, discos, capilares, fibras huecas, agujas, alfileres, fibras sólidas, perlas de celulosa, perlas de vidrio poroso, geles de sílice, perlas de poliestireno opcionalmente reticuladas con divinilbenceno, perlas de copolímero injertado, perlas de poliacrilamida, perlas de látex, perlas de dimetilacrilamida opcionalmente reticuladas con N-N'-bis-acriloletilendiamina y perlas recubiertas con un polímero hidrófobo.

- 30 Si se desea, las moléculas que se van a añadir al soporte sólido se pueden funcionalizar fácilmente para crear restos de estireno o acrilato, de modo que se permite la incorporación de las moléculas en poliestireno, poliacrilato u otros polímeros, tales como poliimida, poliacrilamida, polietileno, polivinilo, polidiacetileno, polifenileno-vinileno, polipéptido, polisacárido, polisulfona, polipirrol, polimidazol, politiofeno, poliéter, epoxis, vidrio de sílice, gel de sílice, siloxano, polifosfato, hidrogel, agarosa, celulosa y similares.

- 35 Si en los ensayos se usa más de un antígeno del VHC, por ejemplo un polipéptido NS3 modificado y un MEFA u otro antígeno del VHC, los antígenos se pueden proporcionar sobre el mismo sustrato sólido o sobre diferentes sustratos sólidos que se combinan en el ensayo. Por tanto, por ejemplo, los antígenos pueden estar presentes en forma de entidades pequeñas sobre, por ejemplo, una placa, o puede estar presentes en forma de, por ejemplo, micropérlas individuales que se añaden para el uso en el ensayo de interés.

- 40 En un contexto, como se representa en la Figura 2, primero se hace reaccionar un soporte sólido con los antígenos del VHC, tales como un polipéptido NS3 modificado, por ejemplo NS3PI.1165 o d.4a.t.N S3PI.1165, y un MEFA, tal como MMEFA 7,1 (en conjunto denominados en el presente documento "los componentes de fase sólida") en condiciones de unión adecuadas de modo que las moléculas queden suficientemente inmovilizadas sobre el soporte. En ocasiones, la inmovilización sobre el soporte se puede potenciar acoplado primero el antígeno a una proteína
- 45 con mejores propiedades de unión en fase sólida. Proteínas de acoplamiento adecuadas incluyen, entre otras, macromoléculas tales como seroalbúminas, incluida seroalbúmina bovina (BSA), hemocianina de lapaliforniana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina y otras proteínas bien conocidas para los expertos en la técnica. Otros reactivos que se pueden usar para unir moléculas al soporte incluyen polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y similares. Los expertos en la técnica conocen bien dichas moléculas y procedimientos de acoplamiento de estas moléculas a antígenos. Véase, por ejemplo, Brinkley, M.A. (1992) Bioconjugate Chem. 3:2-13; Hashida y col. (1984) J. Appl. Biochem. 6:56-63; y Anjaneyulu y Staros (1987) International J. of Peptide and Protein Res. 30:117-124.
- 50

- Después de la reacción del soporte sólido con los componentes de fase sólida, mediante lavado se eliminan del soporte todos los componentes de fase sólida no inmovilizados y, después, los componentes unidos al soporte se ponen en contacto con una muestra biológica del a la que se sospecha que contiene anticuerpos anti-VHC (denominados en conjunto en el presente documento "moléculas ligando") en condiciones de unión adecuadas. Si en la muestra hay anticuerpos frente al VHC, formarán un complejo con los antígenos del VHC. Después de lavar para eliminar todas las moléculas ligando no unidas se añaden los anticuerpos marcados de forma detectable, tales como anticuerpos anti-xenogénicos (p. ej., anti-humanos) que reconocen un epítopo sobre anticuerpos anti-VHC.
- 55

Estos anticuerpos se unen debido a la formación del complejo.

En la Figura 12 se muestra otro formato de ensayo. Este formato de ensayo, bien conocido en la técnica, usa un soporte sólido recubierto con estreptavidina que ha reaccionado con anticuerpos marcados con biotina que se unen a NS3 modificada y, opcionalmente, a un MEFA, tal como MEFA 7,1. La muestra se añade en condiciones de unión adecuadas. Si en la muestra hay anticuerpos frente al VHC, formarán un complejo con los antígenos del VHC. Después de lavar para eliminar todas las moléculas ligando no unidas se añaden los anticuerpos marcados de forma detectable, como se ha descrito anteriormente.

En un formato homogéneo, la muestra de prueba se incubaba con la combinación de antígenos en solución. Por ejemplo, puede ser en condiciones que precipiten cualquier complejo antígeno-anticuerpo que se haya formado. En la técnica también se conocen formatos tanto convencionales como competitivos para los ensayos homogéneos.

En un formato convencional, la cantidad de anticuerpos frente al VHC que forman el complejo antígeno-anticuerpo está controlada directamente. Esto se puede conseguir determinando si los anticuerpos anti-xenogénicos (p. ej., anti-humanos) que reconocen un epítipo sobre anticuerpos anti-VHC se unirán debido a la formación del complejo. En un formato competitivo, la cantidad de anticuerpos contra el VHC en la muestra se deduce monitorizando el efecto de la competición sobre la unión de una cantidad conocida de anticuerpo marcado (u otro ligando competitivo) en el complejo.

Más particularmente, los complejos formados que comprenden anticuerpo anti-VHC (o, en el caso de los ensayos competitivos, la cantidad de anticuerpo competitivo) se detectan mediante cualquiera de una serie de técnicas conocidas, dependiendo del formato. Por ejemplo, los anticuerpos frente al VHC no marcados en el complejo se pueden detectar usando un conjugado de Ig anti-xenogénica en complejo con un marcador (p. ej., un marcador enzimático). En un formato de ensayo de inmunoprecipitación o a glutinación, la reacción entre los antígenos del VHC y el anticuerpo forma una red que precipita en la solución o suspensión y forma una capa o película visible de precipitado. Si no hay anticuerpo anti-VHC presente en la muestra de prueba, no se forma ningún precipitado visible. Los reactivos de ensayo descritos con anterioridad, incluido el soporte sólido de inmunoensayo con anticuerpos y antígenos unidos, así como los anticuerpos y antígenos que se van a hacer reaccionar con la muestra capturada, se pueden proporcionar en kit, con instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, con el fin de realizar los inmunoensayos tal como se ha descrito anteriormente. Normalmente el kit contendrá en contenedores separados la combinación de antígenos (ya unidos a una matriz sólida o por separado con reactivos para su unión a la matriz), formulaciones de anticuerpo control (positivos y/o negativos), anticuerpos marcados cuando el formato de ensayo lo requiere y reactivos generadores de señal (p. ej., sustrato enzimático) si el marcador no genera una señal directamente. Normalmente en el kit vienen incluidas las instrucciones (p. ej., por escrito, cinta, VCR, CD-ROM etc.) para llevar a cabo el ensayo. El kit también puede contener, según el inmunoensayo concreto usado, otros reactivos y materiales envasados (es decir, tampones de lavado y similares). Los inmunoensayos estándar, como los que se han descrito en lo que antecede, se pueden realizar usando estos kits.

### III. Parte experimental

A continuación se encuentran ejemplos de formas de realización específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y no están destinados a limitar el ámbito de la presente invención de ningún modo.

Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se permiten algunos errores y desviaciones experimentales.

#### Ejemplo 1

Producción de proteínas NS3 modificadas

##### I. NS34aPI

NS34aPI, con mutaciones en el dominio helicasa de NS3 pero no en el dominio proteasa, se produjo para la expresión en el vector de expresión de levaduras pBS24.1, del siguiente. NS3 4aPI incluye la secuencia de aminoácidos para el polipéptido NS3/4a nativo, con la excepción de que el aminoácido Thr-1428 y Ser-1429, numerados respecto a la secuencia de longitud completa del VHC-1, han mutado a Pro e Ile, respectivamente. El vector de expresión de levaduras pBS24.1 contiene 2 secuencias para la replicación autónoma en levaduras y los genes de levaduras leu2-d y URA3 como marcadores seleccionables. El gen de la  $\beta$ -lactamasa y el origen de replicación de ColE1, requerido para la replicación del plásmido en bacterias, también están presentes en este vector de expresión. El plásmido pd.hcvla.ns3ns4aPI, que codifica NS34aPI, se produjo del siguiente modo. Se usó un procedimiento de dos etapas. Primera, se ligaron las siguientes piezas de ADN: (a) oligonucleótidos sintéticos que proporcionarían un sitio de clonación HindIII en 5', seguido de una secuencia ACAAACAAA (SEC ID N° 12), el iniciador ATG, y los codones para VHC1a, comenzando con el aminoácido 1027 y continuando a un sitio BglII en el aminoácido 1046; (b) un fragmento de restricción de 683 bp BglII-Clal (que codifica los aminoácidos 1046-1274) de pAChLTns3ns4aPI; y (c) un vector pSP72 (Promega, Madison, WI, GenBank/EMBL Número de Registro X65332) que se ha digerido con HindIII y Clal, desfosforilado y purificado en gel. El plásmido pAChLTns3ns4aPI se obtuvo de

pAChLT, un vector de expresión en baculovirus disponible comercialmente en BD Pharmingen (San Diego, CA). En concreto, se preparó un vector pAChLT EcoRI-PstI, así como los fragmentos siguientes: EcoRI-Alw<sup>nl</sup>, 935 pb correspondiente a los aminoácidos 1027-1336 del genoma del VHC-1; Alw<sup>nl</sup>-SacII, 247 pb, correspondiente a los aminoácidos 1336-1419 del genoma del VHC-1; HinfI-BglII, 175 pb, correspondiente a los aminoácidos 1449-1509 del genoma del VHC-1; BglII-PstI, 619 pb, correspondiente a los aminoácidos 1510-1711 del genoma del VHC-1, más el codón de terminación de la transcripción. Un fragmento de 91 pb generado sintéticamente con SacII-HinfI correspondiente a los aminoácidos 1420-1448 del genoma de VHC-1 y que contiene las mutaciones PI (Thr-1428 mutada a Pro, Ser-1429 mutada a Ile), se unió con el fragmento HinfI-BglII de 175 pb y el fragmento BglII-PstI de 619 pb descritos anteriormente y subclonados en un vector pGEM-5Zf(+) digerido con SacII y PstI. pGEM-5Zf(+) es un vector de E. coli disponible comercialmente (Promega, Madison, WI, GenBank/EMBL Número de Registro X65308). Tras la transformación de las células HB101 competentes, el análisis de minicribado de los clones individuales y la verificación de la secuencia, un fragmento SacII-PstI de 885 pb del clon 2 de pGEM5.PI se purificó en gel. Este fragmento se ligó con el fragmento de 935 pb de EcoRI-Alw<sup>nl</sup>, el fragmento de 247 pb de Alw<sup>nl</sup>-SacII y el vector pAChLT EcoRI-PstI, como se ha descrito anteriormente. La construcción resultante se denominó pAChLTns3ns4aPI.

La mezcla de unión anterior se transformó en células HB101 competentes y se sembró en placas de agar Luria que contienen 100 µg/ml de ampicilina. Los análisis miniprep de los clones individuales condujeron a la identificación de supuestos positivos, dos de los cuales se amplificaron. El ADN plasmídico para pSP72.1aHC, se prepararon los clones nº 1 y 2 con un kit Qiagen Maxip y se secuenciaron.

Después, se ligaron los siguientes fragmentos: (a) un fragmento HindIII-ClaI de 761 pb de pSP72.1aHC #1 (pSP72.1aHC se generó uniendo los siguientes: pSP72 que se había digerido con HindIII y ClaI, oligonucleótidos sintéticos que proporcionarían un sitio de clonación HindIII en 5', seguido de una secuencia ACAAACAAA (SEC ID N° 12), el codón de iniciación ATG, y los codones para VHC1a, comenzando con el aminoácido 1027 y continuando a un sitio BglII en el aminoácido 1046, y un fragmento de restricción BglII-ClaI de 683 bp (que codifica los aminoácidos 1046-1274 de pAChLTns3ns4aPI); (b) un fragmento BamHI-HindIII de 1353 pb para el promotor híbrido de levaduras ADH2/GAPDH; (c) un fragmento ClaI-Sall de 1320 pb (que contiene los aminoácidos 1046-1711 del VHC1a con la Thr 1428 mutada a Pro y la ser 1429 mutada a Ile) de pAChLTns3ns4aPI; y (d) el vector de expresión en levaduras pBS24.1 que se había digerido con BamHI y Sall, desfosforilado y purificado en gel. La mezcla de unión se transformó en células HB101 competentes y se sembró en placas de agar Luria que contienen 100 µg/ml de ampicilina. Los análisis miniprep de los clones individuales condujeron a la identificación de clones con el inserto BamHI-Sall de 3446 pb que estaba compuesto por el promotor ADH2/GAPDH, el codón de iniciación ATG y NS34a de VHC1a de los aminoácidos 1027-1711, con la Thr 1428 mutada a Pro y la Ser 1429 mutada a Ile. La construcción resultante se denominó pd.HCV1a.ns3ns4aPI.

La cepa AD3 de S. cerevisiae se transformó con pd.HCV1a.ns3ns4aPI y los transformantes sencillos se comprobaron para detectar la expresión tras la depleción de glucosa en el medio. La proteína recombinante se expresó a niveles altos en levaduras, detectado mediante tinción con azul de Coomassie y se confirmó mediante análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo policlonal frente al dominio helicasa de NS3.

La proteína NS3/4a se purificó del siguiente modo. Las células de S. cerevisiae anteriores que expresan la proteína NS34aPI se recogieron y las células se suspendieron en tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl, 0,5 M, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, pepstatina 0,1 µM, leupeptina 1 µM) y se lisaron en un Dyno-Mill (Wab Willy A. Bachofen, Basilea, Suiza) o un aparato equivalente usando perlas de vidrio, a una proporción de 1:1:1 de células:tampón:perlas de vidrio de 0,5 mm. El lisado se centrifugó a 30100 x g durante 30 minutos a 4 °C y el sedimento que contenía la fracción de proteína insoluble se añadió al tampón de lavado (6 ml/g peso inicial del sedimento celular) y se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El tampón de lavado consistió en NaPO<sub>4</sub> 50 mM, a pH 8,0, NaCl 0,3M, β-mercaptoetanol 5 mM, 10% de glicerol octilglucósido al 0,05 %, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, pepstatina 0,1 µM, leupeptina 1 µM.

Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 30.100 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desechó y se conservó el precipitado.

La proteína se extrajo del precipitado del siguiente modo. Se añadió tampón de extracción 6 ml/g t se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El tampón de extracción consistió en Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 1M, β-mercaptoetanol 5 mM, 10% de glicerol, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, pepstatina 0,1 µM, leupeptina 1 µM. Esto se centrifugó a 30.100 c g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se conservó y se añadió sulfato amónico al 17,5 % usando la fórmula siguiente: Volumen del sobrenadante (ml) multiplicado por x % de sulfato amónico/(1-x% de sulfato amónico)= ml de sulfato amónico saturado 4,1M para añadir al sobrenadante. Gota a gota se añadió el sulfato amónico en agitación en hielo y la solución se agitó en hielo durante 10 minutos. La solución se centrifugó a 17.700 x g durante 30 minutos a 4 °C y el precipitado se conservó y se almacenó a una temperatura de 2 °C a 8 °C durante hasta 48 horas.

El precipitado se resuspendió y pasó por una columna de poli U (Sefarosa 4B Poli U, Amersham Pharmacia) a 4 °C del siguiente modo. El precipitado se resuspendió en 6 ml de tampón de equilibrado poli U por gramo de peso de precipitado. El tampón de equilibrado consistió en HEPES 25 mM a pH 8,0, NaCl 200 mM, DT 5 mM (fresco añadido), 10% de glicerol, 1,2 de octilglucósido. La solución se agitó a 4 °C durante 15 minutos y se centrifugó a

31.000 x g durante 30 minutos a 4 °C.

Se preparó una columna de Poli U (1 ml de resina por gramo de peso del precipitado de partida). El caudal lineal fue 60 cm/h y el caudal de empaquetamiento fue 133 % de 60 cm/h. La columna se equilibró con tampón de equilibrado y el sobrenadante del precipitado de sulfato amónico resuspendido se cargó sobre la columna equilibrada. La columna se lavó hasta el nivel basal con el tampón de equilibrado y la proteína eluyó con una etapa de elución en el siguiente tampón de elución de poli U: HEPES 25 mM a pH 8,0, NaCl 1M, DTT 5 mM (fresco añadido), 10% de glicerol, 1,2 de octilglucósido. El eluido de la columna se pasó con SDS-PAGE (con tinción de Coomassie) y las alícuotas se congelaron y almacenaron a -80 °C. La presencia de la proteína NS34aPI se confirmó mediante transferencia de tipo Western usando un anticuerpo policlonal dirigido contra el dominio de la NS3 proteasa y un anticuerpo monoclonal contra el epítipo 5-1-1 (VHC4a).

Adicionalmente, la actividad de la enzima proteasa se monitorizó durante la purificación del siguiente modo. Un péptido NS4a (KKGS-VVIVGRIVLSGKPAIIPKK, SEC ID N° 13) y la muestra que contenía la proteína NS34aPI se diluyeron en 90 µl del tampón de reacción (Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 0,15M, EDTA 0,5 mM, 10% de glicerol, 0,05 n-dodecil-B-D-Maltósido, DTT 5 mM) y se dejó mezclar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 90 µl de la mezcla a una placa de microtitulación (Costar, Inc., Coming, NY) y se añadieron 10 µl del sustrato del VHC (AnaSpec, Inc., San Jose CA). La placa se mezcló y leyó en un lector de placas Fluostar. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia relativa (UFR) por minuto.

Usando estos procedimientos, el producto de la extracción con NaCl 1M que contenía actividad de 3,7 UFR/min, el precipitado de sulfato amónico tenía una actividad de 7,5 UFR/min y el producto de la purificación con poliU tenía una actividad de 18,5 UFR/min.

## II. Antígenos NS3 modificados con mutaciones en el dominio de proteasa

Los antígenos NS3 modificados, con una mutación en el dominio de NS3 proteasa, se produjeron usando mutagénesis dirigida de la secuencia de NS34aPI descrita anteriormente. En particular, el codón para la Ser-1165, en la tríada catalítica de la proteasa, se mutó a un codón de Ala. Un diagrama de la construcción NS34aPI que incluye una sustitución de Ala por Ser en la posición 1165 se muestra en la Figura 4A. La secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos de esta construcción se muestran en las Figuras 5A-5C. Esta construcción se denominó "NS34aPI.1165."

Adicionalmente se produjo la proteína NS3 modificada representada en la Figura 4C. Como con la proteína descrita anteriormente, esta NS3 modificada también incluía la mutación PI en el dominio helicasa. La proteína incluía los aminoácidos 1678-1690 de NS4a, seguido de la secuencia de aminoácidos SGS, después los aminoácidos 1029 a 1657 de NS3. La secuencia SGS proporciona una secuencia ligadora flexible que permite que el polipéptido NS4a se pliegue en el bolsillo dentro de la proteasa para crear una molécula enzimáticamente activa. La secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos de la proteína se muestran en las Figuras 7A-7C. Esta construcción se denominó "d.4a.t.NS3PI.1165."

Por último, una proteína NS3 modificada, mostrada en la Figura 4B, que incluía la sustitución Ala en el aminoácido 1165, así como las sustituciones PI en el dominio helicasa, se produjo del siguiente modo. La secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos de esta proteína se muestran en las Figuras 6A-6C. Esta construcción se denominó "NS3PI.1165."

Para construir el vector de expresión en levaduras NS3PI.1165 se realizaron las etapas siguientes. En primer lugar, se generó el plásmido pSP72NS3NS4a.PI.HindIII/ClaI n° 9 mediante unión de un fragmento BglII/ClaI (aislado de pAChLT-NS3NS4aPI, descrito anteriormente) con un oligonucleótido sintético HindIII/BglII de 97 pb (más adelante), después se transformó en HB101.

AGCTTACAAAACAAAATGCATCACCATCACCATCACGCGCC HBgl-1 (SEC ID N° 14)

**GCGTACGCCGTGATGGGCGCGTGATGGTGATGGTGATGCATTTTGT**

**A**

Hbgl-2 (SEC ID N° 15)

**CATCACGGCGTACGCCAGCAGACAAGGGGCCTCCTAGGGTGCATAATCA**

**CCAGCCTAAC**

Hbgl-5 (SEC ID N° 16)

AGGCTGGTGATTATGCACCCTAGGAGGCCCTTGTCTGCTGG Hbgl-6 (SEC ID N° 17)

Después de minicribados y la confirmación de la secuencia, el plásmido pSP72NS3NS4a.PIHindIII/Clal nº 9 se volvió a transformar en células competentes SCS110 de E. coli que se habían sometido a metilación Dam-. Este plásmido se usó después como molde para mutar la Serina 1165 de la triada catalítica de la NS3 proteasa de VHC1a en Alanina usando mutagénesis dirigida (GeneTailor Site-Directed Mutagenesis, Invitrogen, San Diego CA), usando los siguientes cebadores para PCR:

5' TTTCTACTTGAAAGGCTCCgcaGGGGGTCCGCT3' (SEC ID Nº 18)

3'GGGGCCGGGTAAAGGATGAACCTTCCGAGG5' (SEC ID Nº 19)

Después de los análisis de minicribado y la verificación de la secuencia, el clon con la secuencia correcta se denominó pSP72NS3NS4aPImut1165 nº 32. Después, este plásmido se digirió con HindIII y AvrII (BlnI) para preparar un vector para unión con un oligonucleótido sintético de 58 pares de bases que codifica los 14 aa del extremo N del dominio NS3 del VHC1a original, usando los codones preferidos de levaduras.

**AGCTTACAAAACAAAATGGCGCCAATCACTGCTTACGCTCAACAAACCAG  
AGGCCTC**

HA-1 (SEC ID Nº 20)

**CTAGGAGGCCTCTGGTTTGTGAGCGTAAGCAGTGATTGGCGCCATTTTGT**

**TTTGTA**

HA-2 (SEC ID Nº 21)

Después de la transformación en HB101, los análisis de minicribado y la verificación de la secuencia, el plásmido nuevo con la secuencia correcta se denominó pSP72H3/ClalNS3mut1165 #15. Dado que el sitio Clal del dominio NS3 de VHC1a está metilado, se usaron células competentes de E. coli SCS110 para transformar el subclon pSP72H3/ClalNS3mut1165 #15. Después, este plásmido se digirió con HindIII y Clal para preparar un fragmento de 761 pb.

En segundo lugar, un fragmento Clal/EagI de 1129 pb se aisló del plásmido de expresión de baculovirus pAchLTns3ns4aPI. El fragmento Clal/EagI se unió con un oligonucleótido sintético de 195 pb que codifica el extremo C del dominio de NS3 más el péptido NS4a en el vector pSP72 Clal/Sall para crear el subclon pSP72NS3NS4aPI Clal/EagI #30 que se volvió a transformar en células competentes SCS110, una cepa en la que el sitio Clal no estaba metilado como lo estaba en HB101:

**GGCCGACCTGGAGGTCGTACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCGTCC  
TGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGCCTGTCAACAGG**

PI3p-1 (SEC ID Nº 22)

**CTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCCGGAAGCCGGCAATCA  
TACCTGACAGGGAAGTCCTCTAC**

PI3p-2 (SEC ID Nº 23)

**GTCAGGTATGATTGCCGGCTTCCCGGACAAGACGACCCTGCCCACTATGA  
CCACGCAGCCTGTTGACAGGCAATACGC**

PI3p-3 (SEC ID Nº 24)

**GGCCAAAGCAGCCAGGACGCCGCCAACGAGCACCCAGGTGCTCGTGACG  
ACCTCCAGGTC**

PI3p-4 (SEC ID Nº 25)

CGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTGATAAG PI3p-5 (SEC ID Nº 26)

**TCGACTTATCAGCACTCTTCCATCTCATCGAACTCTCGGTAGAGGACTTCC**

**CT**

PI3p-6 (SEC ID N° 27)

A partir de este plásmido se preparó un vector mediante digestión con las enzimas de restricción Ava3 y Sall, de modo que se eliminó el dominio NS4a. En este vector se unió un oligonucleótido sintético de 37 pb y se transformó en HB101.

TGTCGGCCGACCTGGAGGTCGTCACGTGATAAG avsal-1 (SEC ID N° 28)

TCGACTTATCAGCTGACGACCTCCAGGTCGGCCGACATGCA avsal-2 (SEC ID N° 29)

Después de análisis de minicribado y confirmación de secuencia se generó el subclon n° 101 de pSP72 ClaI/Sall NS3PI. Este plásmido se volvió a transformar de nuevo en SCS110, como se ha descrito anteriormente para aislar un fragmento ClaI/Sall de 1320 pb.

Por último, el promotor BamHI/HindIII ADH2/GAPDH, el fragmento HindIII/ClaI de 761 pb y el fragmento ClaI/Sall de 1320 pb se unieron en el vector de expresión en levaduras pBS24.1 BamHI/Sall y se transformó usando la cepa HB101 de E. coli de células competentes. Los análisis miniprep. de las colonias individuales condujeron a la identificación de los clones con un fragmento previsto de 3284 pb. La construcción se denominó pd.NS3PI.1165 #21. La expresión en la cepa AD- de levaduras S. cerevisiae se comprobó como se ha descrito anteriormente para pd.HCV1a.ns3ns4aPI.

El plásmido de expresión en levaduras .4a.t.NS3PI.1165 se produjo del siguiente modo. Un oligonucleótido sintético de 100 pb que codificaba el péptido NS4a, seguido de la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Ser y los aminoácidos 1029-1039 del dominio NS3 se unieron en el vector pSP72N S3NS4aPI mut1165 #32 HindIII/AvrII (descrito anteriormente) y se transformaron en HB101.

AGCTTACAAAACAAATGGGCTGCGTG HA-5 (SEC ID N° 30)

GACCCTGCCCCACTATGACCACGCAGCCCATTTTGTGGTGA HA-6 (SEC ID N° 31)

**GTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCGGTTCCGGTTCCATCACTGCTTAC**

**GCTCAACAAACCAGAGGCCTC**

HA-7 (SEC ID N° 32)

**CTAGGAGGCCTCTGGTTTGTTGAGCGTAAGCAGTGATGGAACCGGAACCG**

**GACAAGAC**

HA-8 (SEC ID N° 33)

Después de análisis de minicribado y confirmación de secuencia se generó pSP724a-t-NS3PI.1165 #14. Después, el consiguiente plásmido se transformó en SCS110 por los motivos descritos anteriormente y se aisló un fragmento HindIII/ClaI de 803 pb. Para crear el plásmido de expresión en levaduras .4a.t.NS3PI.1165, el promotor ADH2/GAPDH BamHI/HindIII se ligó con el fragmento HindIII/ClaI de 803 pb y el fragmento ClaI/Sall de 1158 pb que codifica el extremo 3' de la región NS3PI en el vector de expresión en levaduras pAB24 BamHI/Sall. pd.4a-t-ns3.1165 #4 se transformó en la cepa de levaduras AD3 de S. cerevisiae y se comprobaron los transformantes sencillos para determinar la expresión como se ha descrito anteriormente para pd.HCV1a.ns3ns4aPI.

Las proteínas se purificaron como se ha descrito en lo que antecede. Todas las proteínas mutantes tenían niveles de expresión en levaduras similares a los de NS34aPI y se purificaron hasta una pureza similar a NS34aPI (pureza superior al 90%). El SDS-PAGE y la transferencia Western confirmó la ausencia de actividad proteolítica de los polipéptidos NS3 modificados. En particular, se demostró que NS34aPI.1165 era la proteína de longitud completa sin escindir, y NS3PI.1165 y NS34aPI.1165 no escindieron el MEF A 7.1. Por tanto, las proteínas modificadas carecían de actividad proteolítica.

## **Ejemplo 2**

Inmunoensayos usando los antígenos mutados del VHC

Los antígenos del VHC y, en algunos casos según se especifique, el antígeno MEFA 7.1, se introdujeron en placas para inmunoensayo del siguiente modo. El MEF A 7.1 se produjo como se ha descrito en la patente de EE.UU. n° 6.632.601. MEFA 7.1 es un sustrato natural de la proteasa NS3. El tampón de revestimiento del VHC (NaPO4 50

mM a pH 7,0, EDTA 0,2 mM y 0,1 % de cloroacetamida) se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22  $\mu$ . A continuación, secuencialmente se añadieron los reactivos siguientes al tampón de revestimiento del VHC y se agitó tras cada adición: 2  $\mu$ g/ml de BSA-sulfhidrilo modificado, de una solución de 10 mg /ml (Bayer Corp. Pentax, Kankakee, Illinois); DTT 5 mM de una solución 1M (Sigma, St. Louis, MO); 0,45  $\mu$ g/ml de NS3/4a (concentración de proteína de 0,3 mg/ml); 0,375  $\mu$ g/ml de MEFA 7.1 (concentración de proteína de 1 mg/ml). La solución final se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

A cada pocillo de una placa de fondo plano de unión alta Costar (Corning Inc., Corning, New York) se añadieron 200  $\mu$ l de la solución anterior y las placas se incubaron durante la noche en una cámara de humedad. Después, las placas se lavaron con tampón de lavado (1 x PBS, 0.1% TWEEN-20), se dieron golpecitos para secar y se añadieron 285  $\mu$ l de tampón posrevestimiento Orto (1 x PBS, pH 7,4, 1% BSA, 3% sacarosa). Las placas se incubaron durante al menos 1 hora, se dieron golpecitos y se secaron durante la noche a 2-8 °C. Las placas se introdujeron en una bolsa con desecantes para usos futuros.

Se estudió el rendimiento de los antígenos NS3 modificados en comparación con NS3aPI que carecía de la mutación en el dominio proteolítico. Se usaron paneles de muestras de sangre humana disponibles comercialmente que estaban infectados por VHC. Los paneles de PHV mostrados en las tablas que figura n más adelante se adquirieron en Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA (BBI).

El ensayo del VHC se realizó del siguiente modo: 200  $\mu$ l del tampón diluyente de muestras (1 g/l de caseína, 100 mg/l de SOD recombinante humana, 1 g/l de cloroacetamida, 10 g/l de BSA, 500 mg/l de extracto de levadura, 0,366 g/l de EDTA, 1,162 g/l de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 ml/l de Tween 20, 29,22 g/l de NaCl, 1,627 g/l de NaPO<sub>4</sub>, 1 % de SDS) se añadieron a las placas revestidas. Después, se añadieron 20  $\mu$ l de la muestra. Esto se incubó a 37°C durante una hora. Las placas se lavaron con tampón de lavado (1 x PBS, pH 7,4, 0,1% de Tween-20). Se añadieron 200  $\mu$ l de la solución conjugada (una IgG anti-humana de ratón-HRP, tal como IgG anti-humana de ratón-HRP diluida a 1:22.000 en el sistema del ensayo ORTHO HCV 3.0 ELISA con diluyente conjugado en masa Enhanced SAve (-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Esto se lavó como se ha indicado anteriormente y se añadieron 200  $\mu$ l de la solución sustrato (1 comprimido de OPD/10 ml). El comprimido de OPD contiene o-fenilendiamina diclorhidrato y peróxido de hidrógeno para el desarrollo del color con la reacción con peroxidasa de rábano. Esto se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo mediante la adición de 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N y las placas se leyeron a 492 nm respecto a la absorbancia a 690 nm como control.

Los resultados se muestran en las Tablas 3-6. En concreto, la Tabla 3 muestra los resultados de una comparación del rendimiento en el inmunoensayo de NS3PI.1165 y NS34aPI.1165 frente a NS3 4aPI. Como se muestra en la Tabla 3, ambos mutantes deficientes en proteasa eran inmunorreactivos y tienen aproximadamente el 80-90 % de la reactividad de la molécula control NS34aPI que conservaba la actividad proteolítica cuando se ha revestido a 2X la cantidad. La Tabla 6 muestra los resultados de una comparación del rendimiento en el inmunoensayo de d.4a.t.NS3PI.1165, NS3PI.1165 and NS34aPI.1165 frente a NS34aPI. Como se puede ver en la Tabla 6, cuando se revisten a niveles adecuados, d.4a.t.NS3PI.1165, NS3PI.1165 and NS34aPI.1165 mostraron una inmunorreactividad similar a la de NS34aPI con d.4a.t.NS3PI.1165 y muestra la inmunorreactividad más cercana a NS34aPI.

Como se puede ver en las Tablas 4 y 7, NS3PI.1165, NS34aPI.1165 y d.4a.t.NS3PI.1165 también alcanzaron una inmunorreactividad muy similar a la de NS34aPI cuando se usan en combinación con MEFA 7.1.

La Tabla 5 muestra los resultados de una comparación del rendimiento en el inmunoensayo de NS3PI.1165 y d.4a.t.NS3PI.1165 frente a NS34aPI, en los ensayos en combinación con MEFA 7.1 o si n MEFA 7.1. Como se puede ver, ambos mutantes, usados solos o en combinación con MEFA 7.1, alcanzaron una inmunorreactividad muy similar a la del NS34aPI nativo. Por tanto, las tres proteínas NS3 analizadas tienen in inmunorreactividad.

Estas tres proteínas NS3 modificadas tenían actividad helicasa (datos no mostrados), pero estaban desprovistas de actividad proteasa. Además, como se muestra en las Figuras 13 y 14, las proteínas mutantes NS3 modificadas no escindieron el MEFA 7.1, un sustrato natural de la NS3 proteasa.

Según el mejor conocimiento de los inventores, esta es la primera demostración de que la inmunorreactividad y la actividad proteasa de NS3 se pueden separar y de que eliminar la actividad de serina proteasa no afecta a los sitios de reconocimiento de anticuerpos de la proteína.

### Ejemplo 3

Detección de seroconversión precoz de y comparación con los ensayos disponibles comercialmente

Los antígenos C33c y C200 son muy inmunorreactivos y los anticuerpos frente a estos antígenos se encuentran en los paneles de seroconversión precoz. Por tanto, el rendimiento de d.4a.t.NS3PI.1165 más MEFA 7.1 o NS34aPI más MEFA 7.1 en los inmunoensayos se estudió usando los paneles de C33c y C200 bien caracterizados disponibles comercialmente de muestras de sangre humana infectada por el VHC para evaluar la sensibilidad de la seroconversión y estos resultados se compararon con los obtenidos en los kits de ELISA anti-VHC comerciales. En

concreto, el ensayo Abbott PRISM (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) está disponible comercialmente y es un ensayo de detección basado en anticuerpos. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El sistema ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System (HCV 3.0) (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) es un ensayo de detección basado en anticuerpos. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 5 Los resultados se muestran en la Tabla 7. Para los paneles estudiados, tanto NS3aPI más MEFA 7.1 como d.4a.t.NS3PI.1165 más MEFA 7.1 detectaron anticuerpos de tipo c33c- y c200 en los paneles de seroconversión precoz. Las detecciones se realizaron 2-12 días antes de los ensayos Ortho HCV 3.0 y Abbott Prism.

**TABLA 3: Inmunorreactividad de las proteínas NS3 mutantes introducidas solas sin MEFA 7.1**

|           | NS3 PI.116 |      |          |      | NS34a PI.1165 |      |          |      |  | NS34a PI |       |
|-----------|------------|------|----------|------|---------------|------|----------|------|--|----------|-------|
|           | (90 ng)    |      | (180 ng) |      | (90 ng)       |      | (180 ng) |      |  | (90 ng)  |       |
|           | Señal      | S/CO | Señal    | S/CO | Señal         | S/CO | Señal    | S/CO |  | Señal    | S/CO  |
| PHV9D4-1  | 0,024      | 0,04 | 0,027    | 0,04 | 0,029         | 0,05 | 0,037    | 0,06 |  | 0,034    | 0,054 |
| PHV904-2  | 0,023      | 0,04 | 0,026    | 0,04 | 0,033         | 0,05 | 0,037    | 0,06 |  | 0,024    | 0,038 |
| PHV904-3  | 0,523      | 0,85 | 0,785    | 1,28 | 0,904         | 1,47 | 1,041    | 1,68 |  | 1,590    | 2,560 |
| PHV904-4  | 1,002      | 1,64 | 1,785    | 2,90 | 3,020         | 4,91 | 3,211    | 5,19 |  | 3,435    | 5,532 |
| PHV904-5  | 1,521      | 2,49 | 2,720    | 4,42 | 3,528         | 5,74 | 3,559    | 5,75 |  | 3,547    | 5,711 |
| PHV904-6  | 2,076      | 3,39 | 3,210    | 5,22 | 3,569         | 5,80 | 3,582    | 5,79 |  | 3,533    | 5,689 |
| PHV904-7  | 2,466      | 4,03 | 3,903    | 6,35 | 3,874         | 6,30 | 3,874    | 6,26 |  | 3,874    | 6,238 |
| PHV913-1  | 0,012      | 0,02 | 0,013    | 0,02 | 0,02          | 0,03 | 0,026    | 0,04 |  | 0,025    | 0,041 |
| PHV913-2  | 0,013      | 0,02 | 0,013    | 0,02 | 0,016         | 0,03 | 0,022    | 0,04 |  | 0,023    | 0,037 |
| PHV913-3  | 0,044      | 0,07 | 0,057    | 0,09 | 0,033         | 0,05 | 0,053    | 0,09 |  | 0,057    | 0,092 |
| PHV913-4  | 0,182      | 0,3  | 0,26     | 0,42 | 0,145         | 0,23 | 0,175    | 0,28 |  | 0,346    | 0,557 |
| PHV914-1  | 0,012      | 0,02 | 0,011    | 0,02 | 0,014         | 0,02 | 0,023    | 0,04 |  | 0,02     | 0,032 |
| PHV914-2  | 0,012      | 0,02 | 0,014    | 0,02 | 0,016         | 0,03 | 0,018    | 0,03 |  | 0,018    | 0,029 |
| IPHV914-3 | 0,056      | 0,09 | 0,085    | 0,14 | 0,018         | 0,03 | 0,021    | 0,03 |  | 0,086    | 0,139 |
| PHV914-4  | 0,388      | 0,63 | 0,606    | 0,99 | 0,163         | 0,27 | 0,268    | 0,43 |  | 1,732    | 2,780 |
| PHV914-5  | 0,606      | 0,99 | 1,040    | 1,69 | 0,728         | 1,18 | 1,164    | 1,88 |  | 3,098    | 4,989 |
| PHV914-6  | 0,687      | 1,12 | 1,186    | 1,93 | 0,722         | 1,17 | 1,507    | 2,44 |  | 3,314    | 5,337 |
| PHV914-7  | 0,974      | 1,59 | 1,536    | 2,50 | 2,565         | 4,17 | 3,122    | 5,04 |  | 3,442    | 5,542 |
| PHV914-8  | 1,550      | 2,53 | 2,510    | 4,08 | 3,416         | 5,55 | 3,474    | 5,61 |  | 3,453    | 5,560 |
| PHV914-9  | 2,122      | 3,47 | 3,098    | 5,04 | 3,480         | 5,66 | 3,494    | 5,64 |  | 3,486    | 5,614 |

## ES 2 377 978 T3

**TABLA 4: Inmunorreactividad de las proteínas NS3 mutantes introducidas con MEFA 7.1**

|               | MEFA 7.1 75 ng |      | MEFA 7.1 75 ng    |      | MEFA 7.1 75 ng       |      |
|---------------|----------------|------|-------------------|------|----------------------|------|
|               | NS34a PI. 90ng |      | NS.3 PI. 1165 180 |      | NS34a PI.1165 180 ng |      |
| Seña          | I              | S/CO | Señal             | S/CO | Señal                | S/CO |
| PHV904- 0,02  |                | 0,0  | 0,02 0,0          |      | 0,04                 | 0,0  |
| PHV904- 0,02  |                | 0,0  | 0,02 0,0          |      | 0,04                 | 0,0  |
| PHV904- 0,78  |                | 1,2  | 1,18 1,9          |      | 1,02                 | 1,6  |
| PHV904- 2,40  |                | 3,9  | 3,29 5,3          |      | 3,49                 | 5,5  |
| PHV904- 3,27  |                | 5,3  | 3,55 5,7          |      | 3,61                 | 5,7  |
| PHV904- 3,43  |                | 5,6  | 3,57 5,8          |      | 3,63                 | 5,8  |
| PHV904- 3,89  |                | 6,3  | 3,88 6,3          |      | 3,85                 | 6,1  |
| PHV913- 0,04  |                | 0,0  | 0,02 0,0          |      | 0,04                 | 0,0  |
| PHV913- 0,27  |                | 0,4  | 0,10 0,1          |      | 0,22                 | 0,3  |
| PHV913- 1,26  |                | 2,0  | 0,60 0,9          |      | 1,39                 | 2,2  |
| PHV913- 1,40  |                | 2,3  | 0,85 1,3          |      | 1,76                 | 2,8  |
| PHV914- 0,01  |                | 0,0  | 0,01 0,0          |      | 0,02                 | 0,0  |
| PHV914- 0,01  |                | 0,0  | 0,01 0,0          |      | 0,02                 | 0,0  |
| IPHV914- 0,02 |                | 0,0  | 0,07 0,1          |      | 0,02                 | 0,0  |
| PHV914- 0,42  |                | 0,7  | 0,97 1,5          |      | 0,29                 | 0,4  |
| PHV914- 1,26  |                | 2,0  | 2,31 3,7          |      | 1,63                 | 2,6  |
| PHV914- 1,50  |                | 2,4  | 2,42 3,9          |      | 2,10                 | 3,3  |
| PHV914- 2,33  |                | 3,8  | 3,04 4,9          |      | 3,42                 | 5,4  |
| PHV914- 3,30  |                | 5,4  | 3,4, 5,5          |      | 3,53                 | 5,6  |
| PHV914- 3,38  |                | 5,5  | 3,47 5,6          |      | 3,55                 | 5,6  |

TABLA 5: Inmunorreactividad de las proteínas NS3 mutantes introducidas con MEFA 7.1 (panel izquierdo) o son MEFA 7.1 (panel derecho)

| NS34a y NS3 mutantes en combinación con MEFA 7.1 |                      |         |                          |         |                       |         | NS34aPI y mutantes solos |       |               |      |                      |      |
|--------------------------------------------------|----------------------|---------|--------------------------|---------|-----------------------|---------|--------------------------|-------|---------------|------|----------------------|------|
|                                                  | NS34a PI. y MEFA 7.1 |         | NS.3 PI. 1165 y MEFA 7.1 |         | 4 a.t. NS3 y MEFA 7.1 |         | NS34a PI.                |       | NS.3 PI. 1165 |      | 4 a.t. NS3 (S11665A) |      |
|                                                  | (90 ng)              | (75 ng) | (360 ng)                 | (75 ng) | (180 ng)              | (75 ng) | (90 ng)                  |       | (360 ng)      |      | (180 ng)             |      |
|                                                  | Señal                | S/CO    | Señal                    | S/CO    | Señal                 | S/CO    | Señal                    | S/CO  | Señal         | S/CO | Señal                | S/CO |
| PHV9D4-1                                         | -0,008               | -0,01   | 0,002                    | 0,00    | 0,029                 | 0,05    | 0,120                    | 0,019 | 0,021         | 0,03 | 0,059                | 0,09 |
| PHV904-2                                         | -0,007               | -0,01   | 0,006                    | 0,01    | 0,022                 | 0,04    | 0,018                    | 0,03  | 0,100         | 0,16 | 0,054                | 0,09 |
| PHV904-3                                         | 2,075                | 3,40    | 0,833                    | 1,37    | 1,485                 | 2,46    | 1,853                    | 2,98  | 1,784         | 2,76 | 1,779                | 2,81 |
| PHV904-4                                         | 3,090                | 5,06    | 1,753                    | 2,87    | 2,930                 | 4,85    | 3,015                    | 4,85  | 3,127         | 4,83 | 3,150                | 4,97 |
| PHV904-5                                         | 3,263                | 5,34    | 2,820                    | 4,62    | 3,374                 | 5,59    | 3,169                    | 5,10  | 3,472         | 5,37 | 3,474                | 5,48 |
| PHV904-6                                         | 3,405                | 5,57    | 3,297                    | 5,40    | 3,459                 | 5,73    | 3,388                    | 5,46  | 3,483         | 5,38 | 3,537                | 5,58 |
| PHV904-7                                         | 3,854                | 6,31    | 3,860                    | 6,33    | 3,857                 | 6,38    | 3,907                    | 6,29  | 3,881         | 6,00 | 3,881                | 6,12 |
| PHV913-1                                         | 0,009                | 0,01    | 0,010                    | 0,02    | 0,004                 | 0,01    | 0,016                    | 0,03  | 0,007         | 0,01 | 0,019                | 0,03 |
| PHV913-2                                         | 0,124                | 0,20    | 0,028                    | 0,05    | 0,091                 | 0,15    | 0,017                    | 0,03  | 0,009         | 0,01 | 0,024                | 0,04 |
| PHV913-3                                         | 0,739                | 1,21    | 0,240                    | 0,39    | 0,522                 | 0,86    | 0,115                    | 0,19  | 0,099         | 0,15 | 0,072                | 0,11 |
| PHV913-4                                         | 1,186                | 1,94    | 0,297                    | 0,49    | 0,724                 | 1,20    | 0,600                    | 0,97  | 0,517         | 0,8  | 0,465                | 0,73 |
| PHV914-1                                         | 0,001                | 0,00    | -0,004                   | -0,01   | 0,004                 | -0,01   | 0,026                    | 0,04  | 0,006         | 0,01 | 0,023                | 0,04 |
| PHV914-2                                         | 0,005                | 0,01    | -0,014                   | 0,02    | 0,001                 | 0,00    | 0,023                    | 0,04  | 0,01          | 0,02 | 0,018                | 0,03 |
| IPHV914-3                                        | 0,323                | 0,53    | 0,032                    | 0,05    | 0,069                 | 0,11    | 0,151                    | 0,24  | 0,109         | 0,17 | 0,104                | 0,16 |
| PHV914-4                                         | 1,870                | 3,06    | 0,410                    | 0,67    | 1,157                 | 1,92    | 1,389                    | 2,24  | 1,502         | 2,32 | 1,225                | 1,93 |
| PHV914-5                                         | 2,889                | 4,73    | 1,013                    | 1,66    | 2,615                 | 4,33    | 2,444                    | 3,93  | 2,832         | 4,38 | 2,820                | 4,45 |
| PHV914-6                                         | 2,941                | 4,81    | 1,158                    | 1,90    | 2,567                 | 4,25    | 2,365                    | 3,81  | 2,751         | 4,25 | 2,863                | 4,52 |
| PHV914-7                                         | 3,227                | 5,28    | 2,008                    | 3,29    | 3,165                 | 5,24    | 2,728                    | 4,39  | 3,377         | 5,22 | 3,221                | 5,08 |
| PHV914-8                                         | 3,327                | 5,44    | 3,014                    | 4,94    | 3,327                 | 5,51    | 3,285                    | 5,29  | 3,368         | 5,21 | 3,429                | 5,41 |
| PHV914-9                                         | 3,282                | 5,37    | 3,012                    | 4,94    | 3,364                 | 5,57    | 3,327                    | 5,36  | 3,348         | 5,17 | 3,392                | 5,35 |

Tabla 6: Rendimiento de ensayo de NS3/4aPI introducida sola

|                 | NS3/4a PI |            |            |       | 4a.t NS3PI (S1165 A) |      |            |         | NS3PI (S1165 A) |         |      |            | NS3/4a PI (S1165 A) |        |           |            |
|-----------------|-----------|------------|------------|-------|----------------------|------|------------|---------|-----------------|---------|------|------------|---------------------|--------|-----------|------------|
|                 | 90 ng     | Señal S/CO | Señal S/CO | 90 ng | 180 ng               | S/CO | Señal S/CO | 360 ng  | 90 ng           | 180 ng  | S/CO | Señal S/CO | 90 ng               | 180 ng | S/CO      | Señal S/CO |
| PHV9D4-1        | 0,120 019 |            | 0,027 004  | 0,059 | 0,09 0046            | 0 07 | 0,034 0    | 05 0042 | 0,034 0         | 05 0042 | 0 03 | 0,07 0021  | 0,036 006           | 0 032  | 0,05 0041 | 0 06       |
| PHV904-2 0,018  | 0,03      |            | 0,06       | 0,10  | 0,09 0071            | 0 11 | 0,027 0    | 04 0033 | 0,027 0         | 04 0033 | 0 16 | 0,05 0100  | 0,030 005           | 0 033  | 0,05 0038 | 0 06       |
| PHV904-3        | 1,853 298 |            | 1,005 163  | 1,779 | 2,81 2055            | 3 29 | 0,568 0    | 91 1117 | 0,568 0         | 91 1117 | 2 76 | 1,79 1784  | 0,880 141           | 1 247  | 1,97 1709 | 2 67       |
| PHV904-4        | 3,015 485 |            | 1,983 322  | 3,150 | 4,97 3496            | 5 59 | 0,957 1    | 53 2202 | 0,957 1         | 53 2202 | 4 83 | 3,52 3127  | 2,480 398           | 3 096  | 4,90 3298 | 5 16       |
| PHV904-5        | 3,169 510 |            | 2,854 463  | 3,474 | 5,48 3552            | 5 68 | 1,430 2    | 29 2928 | 1,430 2         | 29 2928 | 5 37 | 4,69 3472  | 2,998 481           | 3 411  | 5,40 3496 | 5 47       |
| PHV904-6        | 3,388 546 |            | 3,133 509  | 3,537 | 5,58 3575            | 5 72 | 1,796 2    | 87 3191 | 1,796 2         | 87 3191 | 5 38 | 5,11 3483  | 3,190 512           | 3 450  | 5,46 3494 | 5 47       |
| PHV904-7        | 3,907 629 |            | 3,899 633  | 3,881 | 6,12 3881            | 6 21 | 2,004 3    | 21 3906 | 2,004 3         | 21 3906 | 6 00 | 6,25 3881  | 3,906 627           | 3 892  | 6,16 3881 | 6 07       |
| PHV913-1        | 0,016 003 |            | 0,007 001  | 0,019 | 0,03 0023            | 0 04 | 0,030 0    | 05 0011 | 0,030 0         | 05 0011 | 0 01 | 0,02 0007  | 0,026 004           | 0 025  | 0,04 0042 | 0 07       |
| PHV913-2        | 0,017 003 |            | 0,017 003  | 0,024 | 0,04 0014            | 0 02 | 0,012 0    | 02 0013 | 0,012 0         | 02 0013 | 0 01 | 0,02 0009  | 0,018 003           | 0 025  | 0,04 0041 | 0 06       |
| PHV913-3        | 0,115 019 |            | 0,081 013  | 0,072 | 0,11 0094            | 0 15 | 0,063 0    | 10 0058 | 0,063 0         | 10 0058 | 0 15 | 0,09 0099  | 0,053 009           | 0 070  | 0,11 0093 | 0 14       |
| PHV913-4        | 0,600 097 |            | 0,339 055  | 0,465 | 0,73 0677            | 1 08 | 0,237 0    | 38 0376 | 0,237 0         | 38 0376 | 0 80 | 0,60 0517  | 0,211 034           | 0 323  | 0,51 0393 | 0 62       |
| PHV914-1        | 0,026 004 |            | 0,015 002  | 0,023 | 0,04 0026            | 0 04 | 0,010 0    | 02 0014 | 0,010 0         | 02 0014 | 0 01 | 0,02 0006  | 0,024 004           | 0 014  | 0,02 0015 | 0 02       |
| PHV914-2        | 0,023     | 0,04       | 0,012      | 0,018 | 0,03 0028            | 0 04 | 0,017 0    | 03 0015 | 0,017 0         | 03 0015 | 0 02 | 0,02 0010  | 0,014 002           | 0 019  | 0,03 0013 | 0 02       |
| IPHV914-3 0,151 | 0,24      |            | 0,077      | 0,104 | 0,16 0175            | 0 28 | 0,067 0    | 11 0095 | 0,067 0         | 11 0095 | 0 17 | 0,15 0109  | 0,024 004           | 0 025  | 0,04 0043 | 0 07       |
| PHV914-4        | 1,389 224 |            | 0,782 127  | 1,225 | 1,93 2306            | 3 69 | 0,432 0    | 69 0895 | 0,432 0         | 69 0895 | 2 32 | 1,43 1502  | 0,209 034           | 0 418  | 0,66 0717 | 1 12       |
| PHV914-5        | 2,444 393 |            | 1,540 250  | 2,820 | 4,45 3424            | 5 48 | 0,733 1    | 17 1592 | 0,733 1         | 17 1592 | 4 38 | 2,55 2832  | 0,836 134           | 1 575  | 2,49 2257 | 3 53       |
| PHV914-6        | 2,365 381 |            | 1,593 259  | 2,863 | 4,52 3455            | 5 53 | 0,744 1    | 19 1779 | 0,744 1         | 19 1779 | 4 25 | 2,85 2751  | 1,113 179           | 2 068  | 3,27 2602 | 4 07       |
| PHV914-7        | 2,728 439 |            | 1,994 324  | 3,221 | 5,08 3505            | 5 61 | 0,936 1    | 50 2053 | 0,936 1         | 50 2053 | 5 22 | 3,29 3377  | 2,175 349           | 3 091  | 4,89 3262 | 5 10       |
| PHV914-8        | 3,285 529 |            | 2,681 435  | 3,429 | 5,41 3487            | 5 58 | 1,446 2    | 31 2897 | 1,446 2         | 31 2897 | 5 21 | 4,63 3368  | 3,251 522           | 3 428  | 5,42 3456 | 5 41       |
| PHV914-9        | 3,327 536 |            | 2,782 452  | 3,392 | 5,35 3461            | 5 54 | 1,525 2    | 44 3038 | 1,525 2         | 44 3038 | 5 17 | 4,86 3348  | 3,258 523           | 3 463  | 5,48 3476 | 5 44       |

TABLA 7: Rendimiento del ensayo: Dirección de seroconversión precoz

| BBI             | NS34a PI. & MEFA 7.1 |         | 4 a.t. NS3 & MEFA 7.1 |         | Dato de campo |       | Días de<br>antelación |
|-----------------|----------------------|---------|-----------------------|---------|---------------|-------|-----------------------|
| ID              | (90 ng)              | (75 ng) | (180 ng)              | (75 ng) | VHC 3.0       | Prism | of Prism              |
| Señal           |                      | S/CO    | Señal                 | S/CO    | S/CO          | S/CO  |                       |
| PHV9D4-1 -0,008 |                      | -0,01   | 0,029                 | 0,05    |               |       |                       |
| PHV904-2 -0,007 |                      | -0,01   | 0,022                 | 0,04    |               |       |                       |
| PHV904-3 2,075  |                      | 3,40    | 1,485                 | 2,46    |               |       |                       |
| PHV904-4 3,090  |                      | 5,06    | 2,930                 | 4,85    |               |       |                       |
| PHV904-5 3,263  |                      | 5,34    | 3,374                 | 5,59    |               |       |                       |
| PHV904-6 3,405  |                      | 5,57    | 3,459                 | 5,73    |               |       |                       |
| PHV904-7 3,854  |                      | 6,31    | 3,857                 | 6,38    |               |       |                       |
| PHV913-1 0,009  |                      | 0,01    | 0,004 0,01            |         | 0,01          | 0,08  |                       |
| PHV913-2 0,124  |                      | 0,20    | 0,091                 | 0,15    | 0,02          | 0,10  | > 2 días              |
| PHV913-3 0,739  |                      | 1,21    | 0,522 0,86            |         | 0,43          | 0,50  |                       |
| PHV913-4 1,186  |                      | 1,94    | 0,724 1,20            |         | 0,54          | 0,59  |                       |
| PHV914-1 0,001  |                      | 0,00    | 0,004                 | -0,01   | 0,00          | 0,06  |                       |
| PHV914-2 0,005  |                      | 0,01    | 0,001 0,00            |         | 0,01          | 0,06  |                       |
| IPHV914-3 0,323 |                      | 0,53    | 0,069 0,11            |         | 0,01          | 0,06  |                       |
| PHV914-4 1,870  |                      | 3,06    | 1,157                 | 1,92    | 0,04          | 0,09  | > 12 días             |
| PHV914-5 2,889  |                      | 4,73    | 2,615 4,33            |         | 0,33          | 0,47  |                       |
| PHV914-6 2,941  |                      | 4,81    | 2,567 4,25            |         | 0,82          | 0,90  |                       |
| PHV914-7 3,227  |                      | 5,28    | 3,165 5,24            |         | 3,10          | 2,41  |                       |
| PHV914-8 3,327  |                      | 5,44    | 3,327 5,51            |         | 4,85          | 4,06  |                       |
| PHV914-9 3,282  |                      | 5,37    | 3,364 5,57            |         | 4,85          | 4,52  |                       |

TABLA 8: Rendimiento de ensayo: Sensibilidad dilucional del genotipo

| Genotipo             | Dilución | NS3NS4a PI | MEFA 7.1    | MEFA 7.1 +<br>NS3NS4a PI | Ortho<br>HCV 3.0 | Monolisa Ver. 2<br>Pasteur |
|----------------------|----------|------------|-------------|--------------------------|------------------|----------------------------|
|                      |          | D.O. D.O.  |             | D.O.                     | D.O.             | D.O.                       |
| 1b 1:500             | 0        | 2,929      | 1,396 2,074 |                          | 0,393            | 0,218                      |
| 1:100                | 00       | 2,506      | 0,826 1,099 |                          | 0,159            | 0,084                      |
| 1:200                | 00       | 1,78       | 0,355 0,403 |                          | 0,045            | 0,028                      |
| 2 a/c                | 1:2500   |            |             | 1,952                    | 0,467            | 1,653                      |
| 1:500                | 0        | 1,868      | 0,717       | 0,917 0,136              |                  | 0,782                      |
| 1:100                | 00       | 0,863      | 0,312 0,395 |                          | 0,049            | 0,286                      |
| 2b 1:250             | 0        | ND         | ND          | 1,430                    | 0,295            | 0,658                      |
| 1:500                | 0        | ND         | ND          | 0,551                    | 0,108            | 0,207                      |
| 1:100                | 00       | ND         | ND          | 0,225                    | 0,032            | 0,061                      |
| 3 <sup>a</sup> 1:250 | 0        |            |             | 2,580                    | 0,514            | 0,941                      |
| 1:500                | 0        | 2,879      | 0,964       | 1,622 0,218              |                  | 0,353                      |
| 1:100                | 00       | 1,676      | 0,432 0,873 |                          | 0,067            | 0,164                      |
| 1:200                | 00       | 0,864      | 0,165 0,398 |                          | 0,023            | 0,050                      |
| 4 <sup>a</sup> 1:250 | 0        |            |             | 23,831                   | 0,632            | 0,462                      |
| 1:500                | 0        | 2,4        | 0,824       | 1,752 0,193              |                  | 0,181                      |
| 1:100                | 00       | 1,169      | 0,265 0,717 |                          | 0,069            | 0,0763                     |
| 5 <sup>a</sup> 1:500 | 0        | 2,889      | 1,763 2,744 |                          | 0,827            | 0,988                      |
| 1:100                | 00       | 2,317      | 1,036 1,587 |                          | 0,316            | 0,395                      |
| 1:200                | 00       | 1,315      | 0,416 0,726 |                          | 0,097            | 0,120                      |
| 6 1:100              |          | 3,406      | 2,872 3,602 |                          | 3,594            | ND                         |
| 1:100                | 0        | 2,978      | 2,455       | 3,224                    | 2,863            | ND                         |
| 1:100                | 00       | 2,841      | 0,984 1,192 |                          | 0,380            | ND                         |
| 1:200                | 00       | 2,262      | 0,509       |                          |                  |                            |

De acuerdo con esto se han divulgado proteínas NS3 del VHC modificadas y usos de las mismas en los ensayos de detección. A partir de lo anterior se apreciará que, aunque en el presente documento se han descrito realizaciones de la invención a efectos ilustrativos, se pueden realizar varias modificaciones sin desviarse del alcance de la invención.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> CHIRON CORPORATION

<120> MUTANTES DE PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DEL VHC Y USOS DE LOS MISMOS

5 <130> 2300-22731.40 (PP22731.0004)

<150> 60/621.790 <151> 25-10-2004

<150> 60/621.502 <151> 22-10-2004

<150> 60/618.390 <151> 12-10-2004

<150> 60/604.858 <151> 27-08-2004

10 <160> 33

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 2061

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> NS34aPI.1165

<400> 1

atggcgccca tcacggcgta cgcccagcag acaagggggc tcctaggggtg cataatcacc  
60

agcctaactg gccgggacaa aaaccaagtg gaggggtgagg tccagattgt gtcaactgct  
120

gccc aaacct tcctggcaac gtgcatcaat ggggtgtgct ggactgtcta ccacgggggc  
180

ggaacgagga ccacgcgct acccaagggc cctgtcatcc agatgtatac caatgtagac  
240

caagaccttg tgggctggcc cgctccgcaa ggtagccgat cattgacacc ctgcacttgc  
300

ggctcctcgg acctttacct ggtcacgagg cacgccgatg tcattcccgt gcgcggcgcg  
360

ggtgatagea ggggcagcct gctgtcgccc cgcccattt cctacttgaa aggctccgca  
420

gggggtccgc tgttgtgccc cgcggggcac gccgtgggca tatttagggc cgcggtgtgc  
480

acccgtaggag tggctaaggc ggtggacttt atccctgtgg agaacctaga gacaaccatg  
 540  
 aggtccccgg tgttcacgga taactcctct ccaccagtag tgccccagag cttccaggtg  
 600  
 gctcacctcc atgctccac aggcagcggc aaaagcacca aggtccccgc tgcatatgca  
 660  
 gctcagggct ataagggtgct agtactcaac ccctctgttg ctgcaacact gggctttggg  
 720  
 gcttacatgt ccaagggtca tgggatcgat cctaacaatca ggaccggggg gagaacaatt  
 780  
 accactggca gccccatcac gtactccacc tacggcaagt tccttgccga cggcgggtgc  
 840  
 tcgggggggag cttatgacat aataatttgt gacgagtgc actccacgga tgccacatcc  
 900  
 atcttgggca ttggcactgt ccttgaccaa gcagagactg cgggggagag actggttgtg  
 960  
 ctgcgcccg ccacccctcc gggctcgtc actgtgcccc atcccaacat cgaggaggtt  
 1020  
 gctctgtcca ccaccggaga gatccctttt tacggcaagg ctatccctct cgaagtaatc  
 1080  
 aaggggggga gacatctcat cttctgtcat tcaaagaaga agtgcgacga actcgccgca  
 1140  
 aagctggtcg cattgggcat caatgcctg gcctactacc ggggtcttga cgtgtcgtc  
 1200  
 atcccgccca tcggcgatgt tgtcgtcgtg gcaaccgatg ccctcatgac cggctatacc  
 1260  
 ggcgacttcg actcgggat agactgcaat acgtgtgtca ccagacagt cgatttcagc  
 1320  
 cttgacccta ccttcaccat tgagacaatc acgtccccc aagatgctgt ctcccgact  
 1380  
 caacgtcggg gcaggactgg cagggggaag ccaggcatct acagatttgt ggcaccgggg  
 1440  
 gagcgccct ccggcatgtt cgactcgtcc gtcctctgtg agtgctatga cgcaggctgt  
 1500  
 gcttggtatg agctcacgcc cgccgagact acagttaggc tacgagcgta catgaacacc  
 1560  
 ccggggcttc ccgtgtgcca ggaccatctt gaattttggg agggcgtctt tacaggcctc  
 1620

actcatatag atgccactt tctatcccag acaaagcaga gtggggagaa ccttccttac  
1680

ctggtagcgt accaagccac cgtgtgcgct agggctcaag cccctcccc atcgtgggac  
1740

cagatgtgga agtgtttgat tgcctcaag cccaccctcc atggggccaac acccctgcta  
1800

tacagactgg gcgctgttca gaatgaaatc accctgacgc acccagtcac caaatacatc  
1860

atgacatgca tgcggccga cctggaggtc gtcacgagca cctgggtgct cgttggcggc  
1920

gtcctggctg ctttggccgc gtattgcctg tcaacaggct gcgtgggtcat agtgggcagg  
1980

gtcgtcttgt ccgggaagcc ggcaatcata cctgacaggg aagtcctcta ccgagagttc  
2040

gatgagatgg aagagtgtg a  
2061

<210> 2

<211> 686

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> NS34aPI.1165

<400> 2

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly  
1 5 10 15

Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly  
20 25 30

Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys  
35 40 45

Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr  
50 55 60

Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr  
85 90 95

5

10

Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala  
100 105 110

Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu  
115 120 125

Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ala Gly Gly Pro Leu  
130 135 140

Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys  
145 150 155 160

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu  
165 170 175

Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro  
180 185 190

Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly  
195 200 205

Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr  
210 215 220

Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly  
225 230 235 240

Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly  
245 250 255

Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly  
260 265 270

Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile  
275 280 285

Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile  
290 295 300

Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val  
305 310 315 320

Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn  
 325 330 335

Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly  
 340 345 350

Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe  
 355 360 365

Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala  
 370 375 380

Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val  
 385 390 395 400

Ile Pro Pro Ile Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met  
 405 410 415

Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys  
 420 425 430

Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu  
 435 440 445

Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly  
 450 455 460

Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly  
 465 470 475 480

Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr  
 485 490 495

Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val  
 500 505 510

Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp  
 515 520 525

His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp  
 530 535 540

Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr  
545 550 555 560

Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro  
565 570 575

Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr  
580 585 590

Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn  
595 600 605

Glu Ile Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met  
610 615 620

Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly  
625 630 635 640

Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val  
645 650 655

Ile Val Gly Arg Val Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp  
660 665 670

Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys  
675 680 685

<210> 3

<211> 1899

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> NS3PI.1165

<400> 3

atggcgccaa tcaactgctta cgctcaacaa accagaggcc tcttaggggtg cataatcacc  
60

agcctaactg gccgggacaa aaaccaagtg gaggggtgagg tccagattgt gtcaactgct  
120

gccccaaacct tcttggcaac gtgcatcaat ggggtgtgct ggactgtcta ccacggggcc  
180

ggaacgagga ccacgcgctc acccaagggt cctgtcatcc agatgtatac caatgtagac  
240

5

10

caagaccttg tgggctggcc cgctccgcaa ggtagccgat cattgacacc ctgcacttgc  
 300  
 ggctcctcgg acctttacct ggtcacgagg cacgccgatg tcattcccgt gcgcggcgg  
 360  
 ggtgatagca ggggcagcct gctgtcgcgc cggccattt cctacttgaa aggtccgca  
 420  
 gggggtccgc tgttgtgccc cgcggggcac gccgtgggca tatttagggc cgcggtgtgc  
 480  
 acccgtggag tggctaaggc ggtggacttt atccctgtgg agaacctaga gacaacctg  
 540  
 aggtccccgg tgttcacgga taactcctct ccaccagtag tgccccagag ctccagggtg  
 600  
 gctcacctcc atgctccac aggcagcggc aaaagcacca aggtcccggc tgcatatgca  
 660  
 gctcagggct ataagggtgt agtactcaac ccctctgttg ctgcaacact gggcttttgt  
 720  
 gcttacatgt ccaaggctca tgggatcgat cctaacaaca ggaccggggg gagaacaatt  
 780  
 accactggca gccccatcac gtactccacc tacggcaagt tccttgccga cggcgggtgc  
 840  
 tcggggggcg cttatgacat aataatttgt gacgagtgc actccacgga tgccacatcc  
 900  
 atcttgggca ttggcactgt ccttgaccac gcagagactg cgggggagag actggttgtg  
 960  
 ctgccaccg ccacccctcc gggctccgtc actgtgcccc atcccaacat cgaggaggtt  
 1020  
 gctctgtcca ccaccggaga gatccctttt tacggcaagg ctatccccc cgaagtaac  
 1080  
 aaggggggga gacatctcat cttctgtcat tcaaagaaga agtgcgacga actcgccgca  
 1140  
 aagctggctg cattgggcat caatgccgtg gcctactacc gcggtcttga cgtgtccgtc  
 1200  
 atcccgcca tcggcgatgt tgtcgtcgtg gcaaccgatg ccctcatgac cggctatacc  
 1260  
 ggcgacttcg actcgggtgat agactgcaat acgtgtgtca ccagacagt cgatttcagc  
 1320  
 cttgacccta ccttcacat tgagacaatc acgtccccc aagatgctgt ccccgcaact  
 1380

caacgtcggg gcaggactgg cagggggaag ccaggcatct acagatttgt ggcaccgggg  
1440

gagcgccctt cggcatgtt cgactcgtec gtcctctgtg agtgctatga cgcaggctgt  
1500

gcttggtatg agctcacgcc cgccgagact acagttagga tacgagcgta catgaacacc  
1560

ccggggcttc ccgtgtgccg ggaccatctt gaattttggg agggcgctctt tacaggcctc  
1620

actcatatag atgccactt tctatcccag acaaagcaga gtggggagaa ccttccttac  
1680

ctggtagcgt accaagccac cgtgtgcgct agggctcaag cccctcccc atcgtgggac  
1740

cagatgtgga agtgtttgat tcgcctcaag cccacctcc atggggcaac acccctgcta  
1800

tacagactgg gcgctgttca gaatgaaatc accctgacgc acccagtcac caaatacatc  
1860

atgacatgca tgtcggccga cctggaggtc gtcacgtga  
1899

<210> 4

<211> 632

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> NS3PI.1165

<400> 4

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly  
1 5 10 15

Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly  
20 25 30

Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys  
35 40 45

Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr  
50 55 60

Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr  
 85 90 95

Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala  
 100 105 110

Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu  
 115 120 125

Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ala Gly Gly Pro Leu  
 130 135 140

Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys  
 145 150 155 160

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu  
 165 170 175

Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro  
 180 185 190

Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly  
 195 200 205

Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr  
 210 215 220

Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly  
 225 230 235 240

Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly  
 245 250 255

Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly  
 260 265 270

Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile  
 275 280 285

Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile  
 290 295 300

Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val  
 305 310 315 320  
 Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn  
 325 330 335  
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly  
 340 345 350  
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe  
 355 360 365  
 Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala  
 370 375 380  
 Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val  
 385 390 395 400  
 Ile Pro Pro Ile Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met  
 405 410 415  
 Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys  
 420 425 430  
 Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu  
 435 440 445  
 Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly  
 450 455 460  
 Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr  
 485 490 495  
 Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val  
 500 505 510  
 Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp  
 515 520 525  
 His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp

|                                                                 |     |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 530                                                             | 535 | 540     |
| Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr |     |         |
| 545                                                             | 550 | 555 560 |
| Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro |     |         |
|                                                                 | 565 | 570 575 |
| Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr |     |         |
|                                                                 | 580 | 585 590 |
| Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn |     |         |
|                                                                 | 595 | 600 605 |
| Glu Ile Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met |     |         |
|                                                                 | 610 | 615 620 |
| Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr                                 |     |         |
| 625                                                             | 630 |         |

<210> 5  
 <211> 1941  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> d.4a.t.NS3PI.1165  
 <400> 5

atgggctgcg tggcatagtg gggcagggc gtcttgccg gttccgggtc catcactgct  
 60

tacgtcctaac aaaccagagg cctcctaggg tgcataatca ccagcctaac tggccgggac  
 120

aaaaaccaag tggaggggtga ggtccagatt gtgtcaactg ctgccccaaac cttcctggca  
 180

acgtgcatca atgggggtgtg ctggactgtc taccacgggg ccggaacgag gaccatcgcg  
 240

tcacccaagg gtctgtcat ccagatgtat accaatgtag accaagacct tgtgggctgg  
 300

cccgctccgc aaggtagccg atcattgaca ccctgcactt gcggtccctc ggacctttac  
 360

ctggtcacga ggcacgccga tgtcattccc gtgcgccggc ggggtgatag caggggcagc  
 420

ctgctgtcgc cccggcccat ttctacttg aaaggctccg caggggggcc getgttgtgc  
480

cccgcggggc acgcggtgg catatttagg gccgcggtgt gcacccgtgg agtggttaag  
540

gcggtggact ttatccctgt ggagaacct gagacaacca tgagggtccc ggtgttcacg  
600

gataactcct ctccaccagt agtgccccag agcttccagg tggtcacct ccatgtccc  
660

acaggcagcg gcaaaagcac caagggtccc gctgcatatg cagctcaggg ctataagggtg  
720

ctagtactca acccctctgt tgctgcaaca ctgggctttg gtgcttacat gtccaaggct  
780

catgggatcg atcctaacat caggaccggg gtgagaacaa ttaccactgg cagccccatc  
840

acgtactcca cctacggcaa gttccttgcc gacggcggtt gctcgggggg cgcttatgac  
900

ataataattt gtgacgagt cactccacg gatgccacat ccatcttggg cattggcact  
960

gtccttgacc aagcagagac tgcgggggag agactggtt tgctcgccac cgccaccct  
1020

ccgggtccg tcactgtgcc ccatcccaac atcgaggagg ttgctctgtc caccacggga  
1080

gagatccctt ttacggcaa ggctatccc ctggaagtaa tcaagggggg gagacatctc  
1140

atcttctgtc attcaaagaa gaagtgcgac gaactcgccg caaagctggt cgcattgggc  
1200

atcaatgccg tggcctacta ccgcggtctt gacgtgtccg tcatcccgcc catcggcgat  
1260

gttgctgtcg tggcaaccga tgcctcatg accggctata ccggcgactt cgactcgggtg  
1320

atagactgca atacgtgtgt caccagaca gtcgatttca gccttgacc taccttacc  
1380

attgagacaa tcacgtccc ccaagatgct gtctcccgca ctcaacgtcg gggcaggact  
1440

ggcaggggga agccaggcat ctacagattt gtggcaccgg gggagcgccc ctccggcatg  
1500

ttcgactcgt ccgtcctctg tgagtgtat gacgcaggct gtgcttggtg tgagctcacg  
1560

cccgccgaga ctacagttag gctacgagcg tacatgaaca ccccggggct tcccgtgtgc  
1620

caggaccatc ttgaattttg ggagggcgtc ttacaggcc tcaatcatat agatgccac  
1680

tttctatccc agacaaagca gagtggggag aaccttcctt acctggtagc gtaccaagcc  
1740

accgtgtgcg ctagggctca agccccctcc ccatcgtggg accagatgtg gaagtgtttg  
1800

attcgctca agccaccct ccatgggcca acacctctgc tatacagact gggcgctgtt  
1860

cagaatgaaa tcacctgac gcaccagtc accaaatata tcatgacatg catgtcggcc  
1920

gacctggagg tcgtcacgtg a  
1941

<210> 6

<211> 646

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> d.4a.t.NS3PI.1165

<400> 6

Met Gly Cys Val Val Ile Val Gly Arg Val Val Leu Ser Gly Ser Gly  
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile  
20 25 30

Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val  
35 40 45

Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys Ile Asn  
50 55 60

Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr Ile Ala  
65 70 75 80

Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp  
85 90 95

Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr Pro Cys

|                                                                                    |     |     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 100                                                                                | 105 | 110 |
| Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val<br>115 120 125     |     |     |
| Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro<br>130 135 140     |     |     |
| Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ala Gly Gly Pro Leu Leu Cys<br>145 150 155 160 |     |     |
| Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg<br>165 170 175     |     |     |
| Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu Glu Thr<br>180 185 190     |     |     |
| Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Val Val<br>195 200 205     |     |     |
| Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly<br>210 215 220     |     |     |
| Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val<br>225 230 235 240 |     |     |
| Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr<br>245 250 255     |     |     |
| Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg<br>260 265 270     |     |     |
| Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe<br>275 280 285     |     |     |
| Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys<br>290 295 300     |     |     |
| Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr<br>305 310 315 320 |     |     |
| Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala<br>325 330 335     |     |     |

Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile Glu  
 340 345 350

Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala  
 355 360 365

Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His  
 370 375 380

Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu Gly  
 385 390 395 400

Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro  
 405 410 415

Pro Ile Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly  
 420 425 430

Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val Thr  
 435 440 445

Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr Ile  
 450 455 460

Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg Thr  
 465 470 475 480

Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg  
 485 490 495

Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala  
 500 505 510

Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu  
 515 520 525

Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His Leu  
 530 535 540

Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His  
 545 550 555 560

Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr Leu Val  
565 570 575

Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser  
580 585 590

Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His  
595 600 605

Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Ile  
610 615 620

Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser Ala  
625 630 635 640

Asp Leu Glu Val Val Thr  
645

<210> 7

<211> 546

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> dominio de NS3 proteasa no modificado nativo

<400> 7

atggcgccca tcacggcgta cgcccagcag acaagggggcc tcctaggggtg cataatcacc  
60

agcctaactg gccgggacaa aaaccaagtg gaggggtgagg tccagattgt gtcaactgct  
120

gccccaaacct tcctggcaac gtgcatcaat ggggtgtgct ggactgtcta ccacggggcc  
180

ggaacgagga ccatcgcgtc acccaagggt cctgtcatcc agatgtatac caatgtagac  
240

caagaccttg tgggctggcc cgctccgcaa ggtagccgat cattgacacc ctgcacttgc  
300

ggctcctcgg acctttacct ggtcacgagg cacgccgatg tcattcccgt gcgcccggcg  
360

ggtgatagca ggggcagcct gctgtcgccc cggeccattt cctacttgaa aggctcctcg  
420

gggggtccgc tgttggtccc cgcggggcac gccgtgggca tatttagggc cgcggtgtgc  
480

accggtggag tggctaaggc ggtggacttt atccctgtgg agaacctaga gacaaccatg  
540

aggtcc  
546

10

<210> 8  
 <211> 182  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> dominio de NS3 proteasa no modificado nativo  
 <400> 8

```

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
 1           5           10           15

Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly
          20           25           30

Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
          35           40           45

Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
          50           55           60

Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
          65           70           75           80

Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr
          85           90           95

Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
          100          105          110

Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu
          115          120          125

Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
          130          135          140

Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
          145          150          155          160

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu
          165          170          175

Glu Thr Thr Met Arg Ser
          180
    
```

10 <210> 9  
 <211> 3297  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> MEFA 7.1  
 15 <400> 9

atggctacaa aggctgtttg tgttttgaag ggtgacggcc cagttcaagg tattattaac  
60

ttcgagcaga aggaaagtaa tggaccagtg aagggtgtggg gaagcattaa aggactgact  
120

gaaggcctgc atggattcca tgttcatgag tttggagata atacagcagg ctgtaccagt  
180

gcaggctctc actttaatcc tctatccaga aaacacgggtg ggccaaagga tgaagagagg  
240

catgttggag acttgggcaa tgtgactgct gacaaagatg gtgtggccga tgtgtctatt  
300

gaagattctg tgatctcact ctcaggagac cattgcatca ttggccgcac actggtggtc  
360

catgaaaaag cagatgactt gggcaaagggt ggaaatgaag aaagtacaaa gacaggaaac  
420

gctggaagtc gtttggcttg tgggtgaatt gggatcgccc agaatttgaa ttctggttgc  
480

aattgctcta tctatcccgg ccatataacg ggtcaccgca tggcatggaa gcttggttcc  
540

gccgccagaa ctacctcggg ctttgtctcc ttgttcgccc caggtgccaa acaaaacgaa  
600

actcacgtca cgggaggcgc agccgcccga actacgtctg ggttgacctc tttgttctcc  
660

ccaggtgcca gccaaaacat tcaattgatt gtcgacttta tcctgtgga gaacctagag  
720

acaaccatgc gatctccggt gttcacggat aactcctctc caccagtagt gccccagagc  
780

ttccaggtgg ctcacctcca tgctcccaca ggagcggca aaagcaccaa ggtccccgct  
840

gcatatgcag ctcagggtta taagggtgcta gtactcaacc cctctgttgc tgcaaacctg  
900

ggctttggtg cttacatgtc caaggctcat gggatcgatc ctaacatcag gaccgggggtg  
960

agaacaatta ccaactggcag ccccatcacg tactccacct acggcaagtt ccttgccgac  
1020

ggcgggtgct cggggggcgc ttatgacata ataatttgtg acgagtgcc a cccacggat  
1080

gccacatcca tcttgggcat tggcactgtc cttgaccaag cagagactgc gggggcgaga  
1140

ctggttgtgc tgcgcaccgc caccctccg ggctccgtca ctgtgcccc tcccaacatc  
1200

gaggagggtg ctctgtccac caccggagag atccctttt acggcaaggc tatccccctc  
1260

gaagtaatca agggggggag acatctcacc ttctgtcatt caaagaagaa gtgcgacgaa  
1320

ctgcgcgcaa agctggtcgc attgggcacc aatgccgtgg cctactaccg cggctctgac  
1380

gtgtccgtca tcccgaccag cggcgatgtt gtctgtgtgg caaccgatgc cctcatgacc  
1440

ggctataccg gcgacttcga ctcggtgata gactgcaata cgtgtgtcac ccagacagtc  
1500

gatttcagcc ttgaccctac cttcaccatt gagacaatca cgctccccc agatgctgtc  
1560

tcccgcactc aacgtcgggg caggactggc agggggaagc caggcatcta cagatttgtg  
1620

gcaccggggg agcgccccctc cggcatgttc gactcgtccg tctctgtga gtgctatgac  
1680

gcaggctgtg cttggtatga gctcacgccc gccgagacta cagttaggct acgagcgtac  
1740

atgaacaccc cggggcttcc cgtgtgccag gaccatcttg aattttggga gggcgtcttt  
1800

acaggcctca ctcatataga tgcccacttt ctatcccaga caaagcagag tggggagaac  
1860

cttccctacc tggtagcgta ccaagccacc gtgtgcgcta gggctcaage ccctccccc  
1920

tcgtgggacc agatgtggaa gtgtttgatt cgctcaagc ccaccctcca tgggccaaca  
1980

ccctgctat acagactggg cgctgttcag aatgaaatca cctgacgca ccagtcacc  
2040

aaatacatca tgacatgat gtgcggccgac ctggagggtc tcaagagcgc atgctccggg  
2100

aagccggcaa tcatacctga cagggaagtc ctctaccgag agttcgatga gatggaagag  
2160

tgctctcagc acttaccgta catcgagcaa gggatgatgc tcgccgagca gttcaagcag  
2220

aaggccctcg gcctctcgcg aggggggcaag ccggcaatcg ttccagacaa agagggtgtg  
2280

tatcaacaat acgatgagat ggaagagtgc tcacaagctg ccccatatat cgaacaagct  
2340

caggtaatag ctcaccagtt caaggaaaaa gtccttggat tgatcgataa tgatcaagtg  
2400

gttggtgactc ctgacaaaga aatcttatat gaggcctttg atgagatgga agaatgcgcc  
2460

tccaaagccg ccttcattga ggaagggcag cggatggcgg agatgctcaa gtctaagata  
2520

caaggcctcc tcgggatact gcgccggcac gttggtcctg gcgagggggc agtgacagtgg  
2580

atgaaccggc tgatagcctt cgcctccaga ggaaccatg tttccccac gcactacgtt  
2640

ccgtctagat cccggagatt cgcctcagcc ctgcccggtt gggcgcgccc ggactataac  
2700

cccccgctag tggagacgtg gaaaaagccc gactacgaac cacctgtggt ccacggcaga  
2760

tcttctcgga gattcgccca ggccctgccc gtttgggccc ggccggacta taaccccccg  
2820

ctagtggaga cgtggaaaaa gcccgactac gaaccacctg tgggtccatgg cagaaagacc  
2880

aaacgtaaca ccaaccggcg gccgcaggac gtcaagttcc cgggtggcgg tcagatcgtt  
2940

ggtcgcaggg gccctcctat ccccaaggct cgtcggcccc agggcaggac ctggggtcag  
3000

cccggttacc cttggccctt ctatggcaat aaggacagac ggtctacagg taagtccctg  
3060

ggtaagccag ggtacccttg gccaaagaa accaaacgta acaccaaccg acggccgcag  
3120

gacgtcaagt tcccgggtgg cggtcagatc gttggtcgca ggggccctcc tatccccaa  
3180

gctcgtcggc ccgagggcag gacctgggct cagcccgggt acccttggcc cctctatggc  
3240

aataaggaca gacgggtctac cggtaagtcc tggggtaagc cagggtatcc ttggccc  
3297

<210> 10

<211> 1099

<212> PRT

<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; MEFA 7.1

&lt;400&gt; 10

Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln  
1 5 10 15

Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val  
20 25 30

Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val  
35 40 45

His Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His  
50 55 60

Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg  
65 70 75 80

His Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala  
85 90 95

Asp Val Ser Ile Glu Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys  
100 105 110

Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly  
115 120 125

Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg  
130 135 140

Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln Asn Leu Asn Ser Gly Cys  
145 150 155 160

Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp  
165 170 175

Lys Leu Gly Ser Ala Ala Arg Thr Thr Ser Gly Phe Val Ser Leu Phe

| 180                                                                                | 185 | 190 |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Ala Pro Gly Ala Lys Gln Asn Glu Thr His Val Thr Gly Gly Ala Ala<br>195 200 205     |     |     |
| Ala Arg Thr Thr Ser Gly Leu Thr Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ala Ser<br>210 215 220     |     |     |
| Gln Asn Ile Gln Leu Ile Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu Glu<br>225 230 235 240 |     |     |
| Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Val<br>245 250 255     |     |     |
| Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser<br>260 265 270     |     |     |
| Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys<br>275 280 285     |     |     |
| Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala<br>290 295 300     |     |     |
| Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val<br>305 310 315 320 |     |     |
| Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys<br>325 330 335     |     |     |
| Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile<br>340 345 350     |     |     |
| Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly<br>355 360 365     |     |     |
| Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu<br>370 375 380     |     |     |
| Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile<br>385 390 395 400 |     |     |
| Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys<br>405 410 415     |     |     |

Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys  
420 425 430

His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu  
435 440 445

Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile  
450 455 460

Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr  
465 470 475 480

Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val  
485 490 495

Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr  
500 505 510

Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg  
515 520 525

Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu  
530 535 540

Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp  
545 550 555 560

Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg  
565 570 575

Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His  
580 585 590

Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala  
595 600 605

His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr Leu  
610 615 620

Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro  
625 630 635 640

Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu  
645 650 655

His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu  
660 665 670

Ile Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser  
675 680 685

Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Ala Cys Ser Gly Lys Pro Ala Ile  
690 695 700

Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu  
705 710 715 720

Cys Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu Ala Glu  
725 730 735

Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Ser Arg Gly Gly Lys Pro Ala  
740 745 750

Ile Val Pro Asp Lys Glu Val Leu Tyr Gln Gln Tyr Asp Glu Met Glu  
755 760 765

Glu Cys Ser Gln Ala Ala Pro Tyr Ile Glu Gln Ala Gln Val Ile Ala  
770 775 780

His Gln Phe Lys Glu Lys Val Leu Gly Leu Ile Asp Asn Asp Gln Val  
785 790 795 800

Val Val Thr Pro Asp Lys Glu Ile Leu Tyr Glu Ala Phe Asp Glu Met  
805 810 815

Glu Glu Cys Ala Ser Lys Ala Ala Leu Ile Glu Glu Gly Gln Arg Met  
820 825 830

Ala Glu Met Leu Lys Ser Lys Ile Gln Gly Leu Leu Gly Ile Leu Arg  
835 840 845

Arg His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu  
850 855 860

Ile Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val  
865 870 875 880

Pro Ser Arg Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg  
885 890 895

Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Thr Trp Lys Lys Pro Asp Tyr  
900 905 910

Glu Pro Pro Val Val His Gly Arg Ser Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala  
915 920 925

Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Thr  
930 935 940

Trp Lys Lys Pro Asp Tyr Glu Pro Pro Val Val His Gly Arg Lys Thr  
945 950 955 960

Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly  
965 970 975

Gly Gln Ile Val Gly Arg Arg Gly Pro Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg  
980 985 990

Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr  
995 1000 1005

Gly Asn Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro  
1010 1015 1020

Gly Tyr Pro Trp Pro Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg  
1025 1030 1035

Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Arg  
1040 1045 1050

Arg Gly Pro Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr  
1055 1060 1065

Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Lys Asp  
1070 1075 1080

Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly Tyr Pro Trp

1085

1090

1095

Pro

<210> 11  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> epítomos del VHC  
 <400> 11  
  
**Gly Ser Ala Ala Arg Thr Thr Ser Gly Phe Val Ser Leu Phe Ala Pro**  
**1 5 10 15**  
  
**Gly Ala Lys Gln Asn**  
**20**  
 10 <210> 12  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 15 <400> 12  
  
**acaaaacaaa**  
**10**  
  
 <210> 13  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 20 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> un péptido NS4a  
 <400> 13  
  
**Lys Lys Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys**  
**1 5 10 15**  
  
**Pro Ala Ile Ile Pro Lys Lys**  
**20**  
 25 <210> 14  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 30 <223> HBgl-1  
 <400> 14  
  
**agcttacaaa acaaaatgca tcaccatcac catcacgcgc c**  
**41**  
 35 <210> 15  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

<223> Hbgl-2

<400> 15

**gcgtacgccg tgatgggcgc gtgatgggga tggatgatgca ttttggtttg ta**  
**52**

<210> 16

<211> 60

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Hbgl-5

<400> 16

**catcacggcg tacgcccagc agacaagggg cctcctaggg tgcataatca ccagcctaac**  
**60**

<210> 17

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Hbgl-6

<400> 17

**aggctgggtga ttatgcaccc taggaggccc cttgtctgct gg**  
**42**

<210> 18

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

<400> 18

**tttcctactt gaaaggctcc gcaggggggc cgct**  
**34**

<210> 19

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

<400> 19

**ggagcctttc aagtaggaaa tgggccgggg**  
**30**

<210> 20

<211> 57

<212> ADN

<213> Artificial

<220>  
<223> HA-1  
<400> 20

**agcttacaaa acaaaatggc gccaatcact gcttacgctc aacaaaccag aggcctc**  
**57**

5 <210> 21  
<211> 57  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> HA-2  
<400> 21

**ctaggaggcc tctggtttgt tgagcgttaag cagtgattgg cgccattttg ttttgta**  
**57**

15 <210> 22  
<211> 84  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> PI3p-1  
<400> 22

**ggccgacctg gaggtcgtca cgagcacctg ggtgctcgtt ggccggcgtcc tggctgcttt**  
**60**

20 **ggccgcgatat tgccctgtcaa cagg**  
**84**

<210> 23  
<211> 73  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> PI3p-2  
<400> 23

**ctgcgtgggc atagtgggca gggctcgtctt gtccgggaag ccggcaatca tacctgacag**  
**60**

**ggaagtcctc tac**  
**73**

30 <210> 24  
<211> 78  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> PI3p-3

35

**gtcaggtatg attgccgget tcccgacaa gacgacctg cccactatga ccacgcagcc**  
60

**tgttgacagg caatacgc**  
78

<210> 25  
<211> 60  
<212> ADN  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> PI3p-4

<400> 25

**ggccaaagca gccaggacgc cgccaacgag caccaggtg ctctgacga cctccaggtc**  
60

10 <210> 26  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
15 <223> PI3p-5

<400> 26

**cgagagttcg atgagatgga agagtgctga taag**  
34

<210> 27  
<211> 53  
20 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> PI3p-6

<400> 27

**tcgacttate agcactcttc catctcatcg aactctcggt agaggacttc cct**  
53

25 <210> 28  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> avsal-1

<400> 28

**tgtcggccga cctggaggtc gtcacgtgat aag**  
33

35 <210> 29  
<211> 41  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> aveal-2  
<400> 29

**tcgacttatc acgtgacgac ctccagggtcg gccgacatgc a**  
**41**

5 <210> 30  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> HA-5  
<400> 30

**agcttacaaa acaaaatggg ctgcgtg**  
**27**

<210> 31  
<211> 41  
15 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> HA-6  
<400> 31

**gaccctgccc actatgacca cgcagcccat tttgtcttgt a**  
**41**

20 <210> 32  
<211> 72  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> HA-7  
<400> 32

**gtcatagtgg gcagggtcgt cttgtccggt tccggtcca tcaactgctta cgctcaacaa**  
**60**

**accagaggcc tc**  
**72**

<210> 33  
30 <211> 58  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> HA-8

35 <400> 33

**ctaggaggcc tctggtttgt tgagcgtaag cagtgatgga accggaaccg gacaagac**  
**58**

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, 4 ó 6, en el que el polipéptido comprende un epítipo conformacional de NS3.
- 5 2. Un soporte sólido para inmunoensayo que comprende un polipéptido de la reivindicación 1 que reacciona específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC.
3. El soporte sólido de inmunoensayo de la reivindicación 2, en el que el soporte sólido comprende además un antígeno de fusión de múltiples epítipos unido al soporte, en el que dicho polipéptido y/o dicho antígeno de fusión de múltiples epítipos reacciona específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC.
- 10 4. El soporte sólido de inmunoensayo de la reivindicación 3, en el que dicho antígeno de fusión de múltiples epítipos comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 10 o una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 80 % que reacciona específicamente con anticuerpos anti-VHC presentes en una muestra biológica de un individuo infectado por VHC.
- 15 5. Un procedimiento de detectar infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra biológica, en el que dicho procedimiento comprende:
  - (a) proporcionar un soporte sólido para inmunoensayo de acuerdo con cualquiera de cualquiera de las reivindicaciones 2-4;
  - (b) combinar una muestra biológica con dicho soporte sólido en condiciones que permitan que los anticuerpos anti-VHC, cuando están presentes en la muestra biológica, se unan a dicho polipéptido y/o dicho antígeno de fusión de múltiples epítipos para formar un primer complejo inmunitario;
  - 20 (c) añadir al soporte sólido de la etapa (b) en condiciones formadoras de complejo dicho anticuerpo marcado de forma que se pueda detectar, en el que el anticuerpo marcado reacciona con dicho complejo inmunitario;
  - (d) detectar un segundo complejo inmunitario formado entre el anticuerpo marcado de forma que se pueda detectar y el primer complejo inmunitario, si existe, como indicación de infección por VHC en la muestra biológica.
  - 25
6. Un kit de ensayo para inmunodiagnóstico que comprende el soporte sólido para inmunoensayo de cualquiera de las reivindicaciones 2-4 e instrucciones para realizar el ensayo inmunodiagnóstico.
7. Un polinucleótido que comprende una secuencia codificadora para el polipéptido de la reivindicación 1.
8. Un vector recombinante que comprende:
  - 30 (a) un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 7;
  - (b) y elementos control unidos operablemente a dicho polinucleótido de modo que la secuencia codificadora se pueda transcribir y traducir en una célula huésped.
9. Una célula huésped transformada con el vector recombinante de la reivindicación 8.
10. Un procedimiento para producir un polipéptido recombinante, que comprende:
  - 35 (a) proporcionar una población de células huésped de acuerdo con la reivindicación 9; y
  - (b) cultivar dicha población de células en condiciones mediante las cuales se expresa el polipéptido codificado por la secuencia codificadora presente en dicho vector recombinante.
11. Un procedimiento para producir un soporte sólido para inmunoensayo, que comprende:
  - 40 (a) proporcionar un soporte sólido; y
  - (b) unir al soporte sólido al menos un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende además unir al soporte sólido en una posición pequeña un antígeno de fusión de múltiples epítipos.

Genoma del VHC y proteínas recombinantes

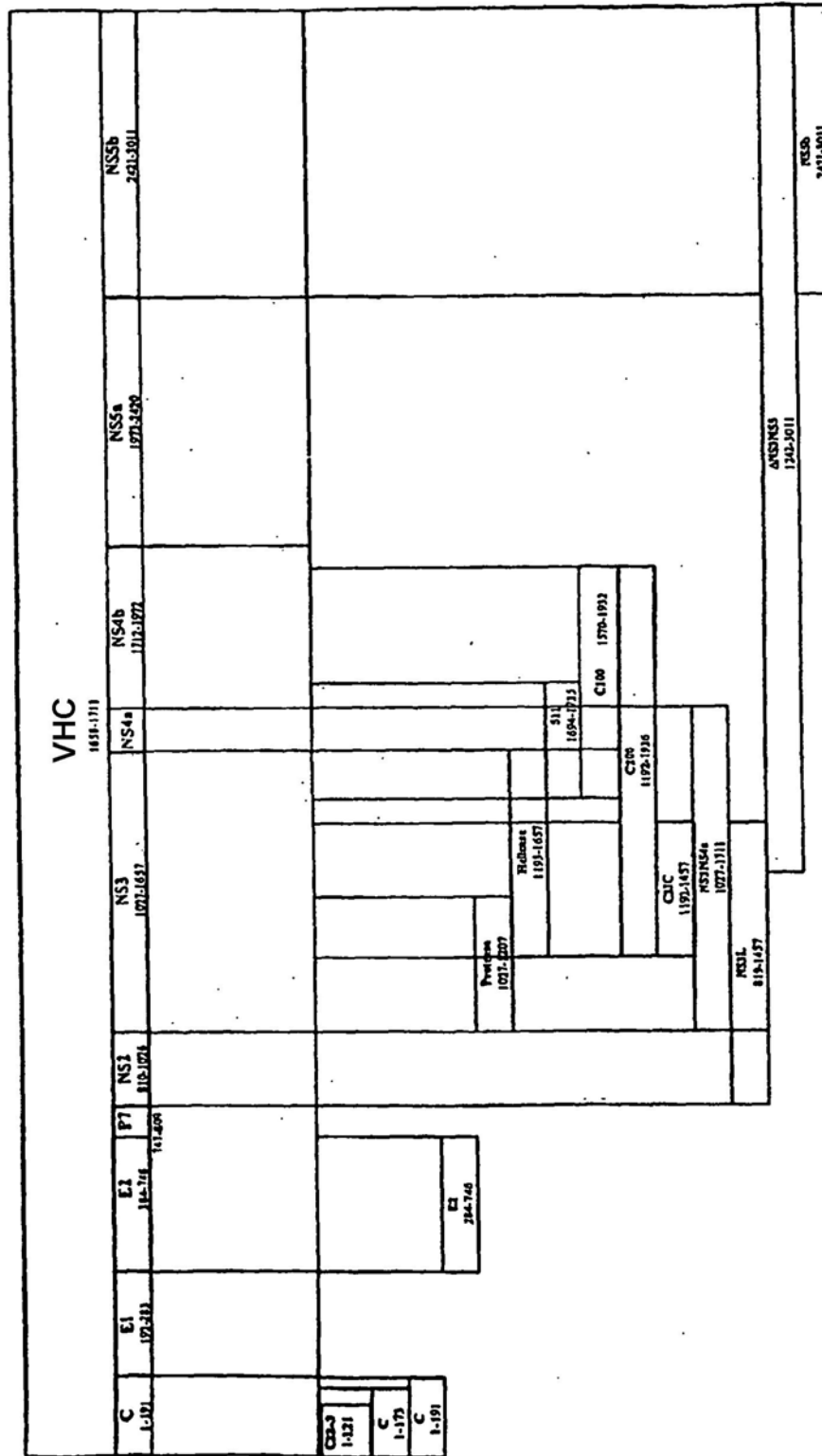
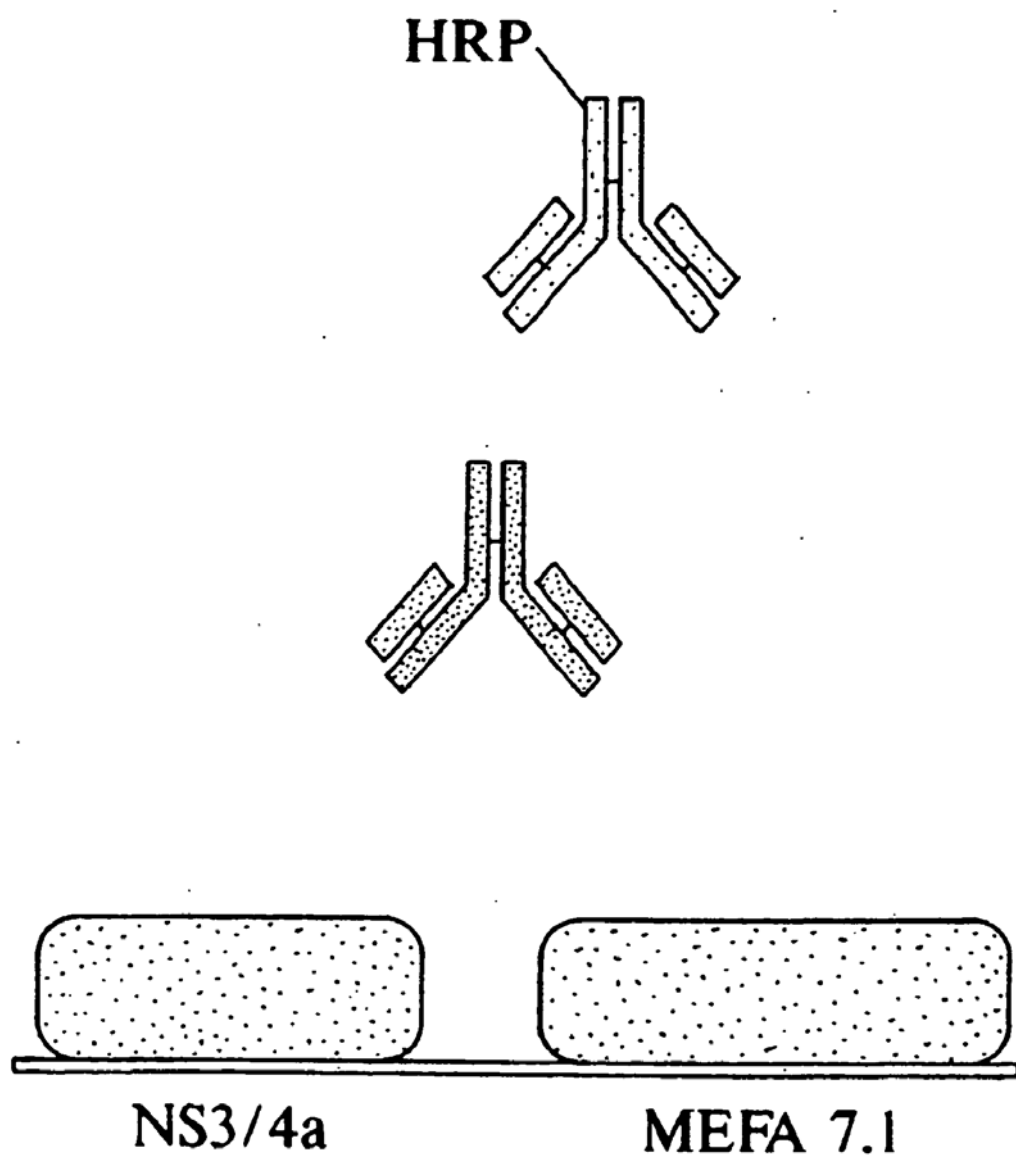


FIG. 1



**FIG. 2**

```

      1                               10
      M A P I T A Y A Q Q
      ATG GCG CCC ATC ACG GCG TAC GCC CAG CAG

      20
      T R G L L G C I I T S L T G R
      ACA AGG GGC CTC CTA GGG TGC ATA ATC ACC AGC CTA ACT GGC CGG

      30                               40
      D K N Q V E G E V Q I V S T A
      AAC AAA AAC CAA GTG GAG GGT GAG GTC CAG ATT GTG TCA ACT GCT

      50
      A Q T F L A T C I N G V C W T
      ACC CAA ACC TTC CTG GCA ACG TGC ATC AAT GGG GTG TGC TGG ACT

      60                               70
      V Y H G A G T R T I A S P K G
      CTC TAC CAC GGG GCC GGA ACG AGG ACC ATC GCG TCA CCC AAG GGT

      80
      P V I Q M Y T N V D Q D L V G
      ACT GTC ATC CAG ATG TAT ACC AAT GTA GAC CAA GAC CTT GTG GGC

      90                               100
      W P A P Q G S R S L T P C T C
      TGG CCC GCT CCG CAA GGT AGC CGA TCA TTG ACA CCC TGC ACT TGC

      110
      G S S D L Y L V T R H A D V I
      TGC TCC TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC GCC GAT GTC ATT

      120                               130
      P V R R R G D S R G S L L S P
      ACC GTG CGC CGG CGG GGT GAT AGC AGG GGC AGC CTG CTG TCG CCC

      140
      R P I S Y L K G S S G G P L L
      TGG CCC ATT TCC TAC TTG AAA GGC TCC TCG GGG GGT CCG CTG TTG

      150                               160
      C P A G H A V G I F R A A V C
      TGC CCC GCG GGG CAC GCC GTG GGC ATA TTT AGG GCC GCG GTG TGC

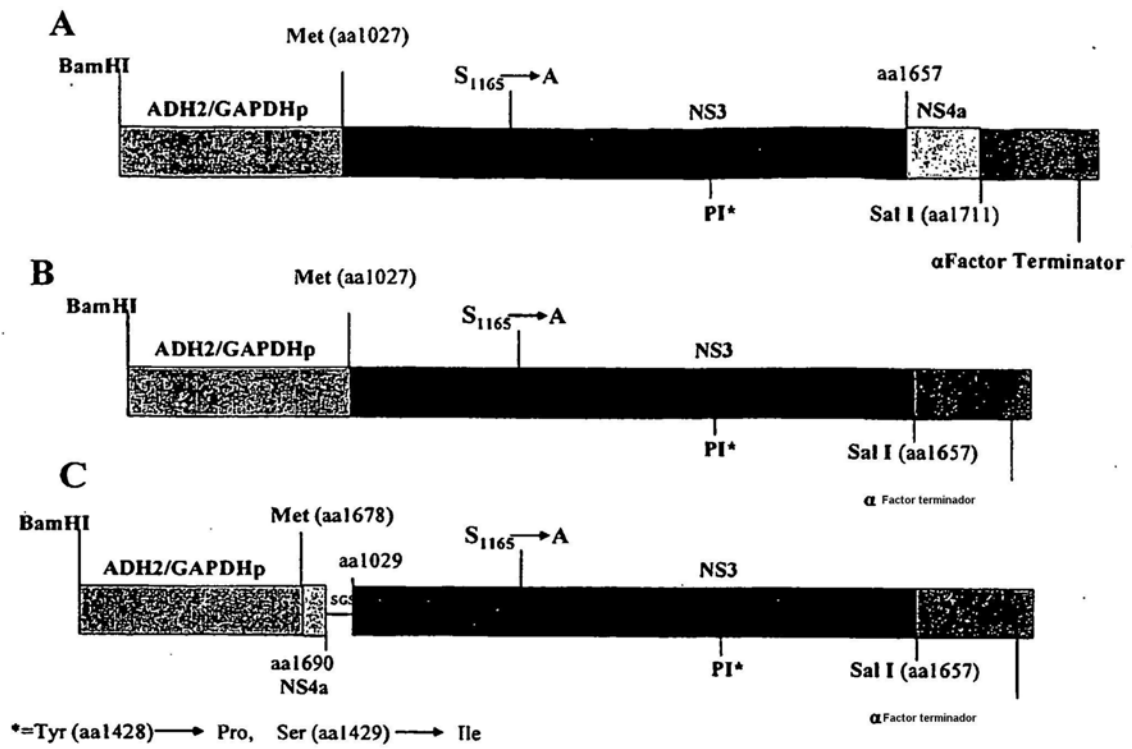
      170
      T R G V A K A V D F I P V E N
      ACC CGT GGA GTG GCT AAG GCG GTG GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC

      180
      L E T T M R S
      CTA GAG ACA ACC ATG AGG TCC

```

FIG. 3

**FIGURA 4**



```

      1                               10
      M A P I T A Y A Q Q T R G L L
      ATG GCG CCC ATC ACG GCG TAC GCC CAG CAG ACA AGG GGC CTC CTA

      20                               30
      G C I I T S L T G R D K N Q V E G E V Q
      GGG TGC ATA ATC ACC AGC CTA ACT GGC CGG GAC AAA AAC CAA GTG GAG GGT GAG GTC CAG

      40                               50
      I V S T A A Q T F L A T C I N G V C W T
      ATT GTG TCA ACT GCT GCC CAA ACC TTC CTG GCA ACG TGC ATC AAT GGG GTG TGC TGG ACT

      60                               70
      V Y H G A G T R T I A S P K G P V I Q M
      GTC TAC CAC GGG GCC GGA ACG AGG ACC ATC GCG TCA CCC AAG GGT CCT GTC ATC CAG ATG

      80                               90
      Y T N V D Q D L V G W P A P Q G S R S L
      TAT ACC AAT GTA GAC CAA GAC CTT GTG GGC TGG CCC GCT CCG CAA GGT AGC CGA TCA TTG

      100                              110
      T P C T C G S S D L Y L V T R H A D V I
      ACA CCC TGC ACT TGC GGC TCC TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC GCC GAT GTC ATT

      120                              130
      P V R R R G D S R G S L L S P R P I S Y
      CCC GTG CGC CGG CGG GGT GAT AGC AGG GGC AGC CTG CTG TCG CCC CGG CCC ATT TCC TAC

      140                              150
      L K G S A G G P L L C P A G H A V G I F
      TTG AAA GGC TCC GCA GGG GGT CCG CTG TTG TGC CCC GCG GGG CAC GCC GTG GGC ATA TTT

      160                              170
      R A A V C T R G V A K A V D F I P V E N
      AGG GCC GCG GTG TGC ACC CGT GGA GTG GCT AAG GCG GTG GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC

      180                              190
      L E T T M R S P V F T D N S S P P V V P
      CTA GAG ACA ACC ATG AGG TCC CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCA GTA GTG CCC

      200                              210
      Q S F Q V A H L H A P T G S G K S T K V
      CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC

      220                              230
      P A A Y A A Q G Y K V L V L N P S V A A
      CCG GCT GCA TAT GCA GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA

      240                              250
      T L G F G A Y M S K A H G I D P N I R T
      ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT CCT AAC ATC AGG ACC

      260                              270
      G V R T I T T G S P I T Y S T Y G K F L
      GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT

```

FIG. 5A

280  
 A D G P C T G / 30325 D I I I C D E C H S  
 GCC GAC GGC GGG TGC TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC  
 290  
 300  
 T D A T S I L G I G T V L D Q A E T A G  
 ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA GCA GAG ACT GCG GGG  
 310  
 320  
 A R L V V L A T A T P P G S V T V P H P  
 GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC  
 330  
 340  
 N I E E V A L S T T G E I P F Y G K A I  
 AAC ATC GAG GAG GTT GCT CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC  
 350  
 360  
 P L E V I K G G R H L I F C H S K K K C  
 CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG AAG AAG TGC  
 370  
 380  
 D E L A A K L V A L G I N A V A Y Y R G  
 GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT  
 390  
 400  
 L D V S V I P P I G D V V V V A T D A L  
 CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG CCC ATC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC  
 410  
 420  
 M T G Y T G D F D S V I D C N T C V T Q  
 ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT ACG TGT GTC ACC CAG  
 430  
 440  
 T V D F S L D P T F T I E T I T L P Q D  
 ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC ACC ATT GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT  
 450  
 460  
 A V S R T Q R R G R T G R G K P G I Y R  
 GCT GTC TCC CGC ACT CAA CGT CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA  
 470  
 480  
 F V A P G E R P S G M F D S S V L C E C  
 TTT GTG GCA CCG GGG GAG CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC TGT GAG TGC  
 490  
 500  
 Y D A G C A W Y E L T P A E T T V R L R  
 TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC ACG CCC GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA  
 510  
 520  
 A Y M N T P G L P V C Q D H L E F W E G  
 GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC  
 530  
 540  
 V F T G L T H I D A H F L S Q T K Q S G  
 GTC TTT ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG ACA AAG CAG AGT GGG  
 550  
 560  
 E N L P Y L V A Y Q A T V C A R A Q A P  
 GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA GCC ACC GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT  
 570

FIG. 5B

580  
 P P S P T D U S O H / B O R 2 5 L I R L K P T L H G  
 CCC CCA TCG TGG GAC CAG ATG TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG  
 600 610  
 P T P L L Y R L G A V Q N E I T L T H P  
 CCA ACA CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC ACC CTG ACG CAC CCA  
 620 630  
 V T K Y I M T C M S A D L E V V T S T W  
 GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG GCC GAC CTG GAG GTC GTC ACG AGC ACC TGG  
 640 650  
 V L V G G V L A A L A A Y C L S T G C V  
 GTG CTC GTT GGC GGC GTC CTG GCT GCT TTG GCC GCG TAT TGC CTG TCA ACA GGC TGC GTG  
 660 670  
 V I V G R V V L S G K P A I I P D R E V  
 GTC ATA GTG GGC AGG GTC GTC TTG TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA CCT GAC AGG GAA GTC  
 680 686  
 L Y R E F D E M E E C O P  
 CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG TGC TGA

FIG. 5C

```

      1                               10
      M A P I T A Y A Q Q T R G L L
      ATG GCG CCA ATC ACT GCT TAC GCT CAA CAA ACC AGA GGC CTC CTA

      20                               30
      G C I I T S L T G R D K N Q V E G E V Q
      GGG TGC ATA ATC ACC AGC CTA ACT GGC CGG GAC AAA AAC CAA GTG GAG GGT GAG GTC CAG

      40                               50
      I V S T A A Q T F L A T C I N G V C W T
      ATT GTG TCA ACT GCT GCC CAA ACC TTC CTG GCA ACG TGC ATC AAT GGG GTG TGC TGG ACT

      60                               70
      V Y H G A G T R T I A S P K G P V I Q M
      GTC TAC CAC GGG GCC GGA ACG AGG ACC ATC GCG TCA CCC AAG GGT CCT GTC ATC CAG ATG

      80                               90
      Y T N V D Q D L V G W P A P G S R S L
      TAT ACC AAT GTA GAC CAA GAC CTT GTG GGC TGG CCC GCT CCG CAA GGT AGC CGA TCA TTG

      100                              110
      T P C T C G S S D L Y L V T R H A D V I
      ACA CCC TGC ACT TGC GGC TCC TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC GCC GAT GTC ATT

      120                              130
      P V R R R G D S R G S L L S P R P I S Y
      CCC GTG CGC CGG CGG GGT GAT AGC AGG GGC AGC CTG CTG TCG CCC CGG CCC ATT TCC TAC

      140                              150
      L K G S A G G P L L C P A G H A V G I F
      TTG AAA GGC TCC GCA GGG GGT CCG CTG TTG TGC CCC GCG GGC CAC GCC GTG GGC ATA TTT

      160                              170
      R A A V C T R G V A K A V D F I P V E N
      AGG GCC GCG GTG TGC ACC CGT GGA GTG GCT AAG GCG GTG GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC

      180                              190
      L E T T M R S P V F T D N S S P P V V P
      CTA GAG ACA ACC ATG AGG TCC CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCA GTA GTG CCC

      200                              210
      Q S F Q V A H L H A P T G S G K S T K V
      CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC

      220                              230
      P A A Y A A Q G Y K V L V L N P S V A A
      CCG GCT GCA TAT GCA GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA

      240                              250
      T L G F G A Y M S K A H G I D P N I R T
      ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT CCT AAC ATC AGG ACC

      260                              270
      G V R T I T T G S P I T Y S T Y G K F L
      GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT

```

FIG. 6A

280  
 A D G P E T C U S 0 6 / 3 0 3 2 5 D I I I C D E C H S  
 GCC GAC GGC GGG TGC TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC  
 290  
 300  
 T D A T S I L G I G T V L D Q A E T A G  
 ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA GCA GAG ACT GCG GGG  
 310  
 320  
 A R L V V L A T A T P P G S V T V P H P  
 GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC CCT CCG GGC TCC GTC ACT VTG CCC CAT CCC  
 330  
 340  
 N I E E V A L S T T G E I P F Y G K A I  
 AAC ATC GAG GAG GTT GCT CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC  
 350  
 360  
 P L E V I K G G R H L I F C H S K K K C  
 CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG AAG AAG TGC  
 370  
 380  
 D E L A A K L V A L G I N A V A Y Y R G  
 GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT  
 390  
 400  
 L D V S V I P P I G D V V V V A T D A L  
 CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG CCC ATC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC  
 410  
 420  
 M T G Y T G D F D S V I D C N T C V T Q  
 ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT ACG TGT GTC ACC CAG  
 430  
 440  
 T V D F S L D P T F T I E T I T L P Q D  
 ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC ACC ATT GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT  
 450  
 460  
 A V S R T Q R R G R T G R G K P G I Y R  
 GCT GTC TCC CGC ACT CAA CGT CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA  
 470  
 480  
 F V A P G E R P S G M F D S S V L C E C  
 TTT GTG GCA CCG GGG GAG CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC TGT GAG TGC  
 490  
 500  
 Y D A G C A W Y E L T P A E T T V R L R  
 TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC ACG CCC GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA  
 510  
 520  
 A Y M N T P G L P V C Q D H L E F W E G  
 GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC  
 530  
 540  
 V F T G L T H I D A H F L S Q T K Q S G  
 GTC TTT ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG ACA AAG CAG AGT GGG  
 550  
 560  
 E N L P Y L V A Y Q A T V C A R A Q A P  
 GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA GCC ACC GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT  
 570

FIG. 6B

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 580 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 590 |     |     |     |     |     |
| P   | P   | S   | W   | D   | Q   | M   | W   | K   | C   | L   | I   | R   | L   | K   | P   | T   | L   | H   | G   |
| CCC | CCA | TCG | TGG | GAC | CAG | ATG | TGG | AAG | TGT | TTG | ATT | CGC | CTC | AAG | CCC | ACC | CTC | CAT | GGG |
|     |     |     |     | 600 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 610 |     |     |     |     |     |
| P   | T   | P   | L   | L   | Y   | R   | L   | G   | A   | V   | Q   | N   | E   | I   | T   | L   | T   | H   | P   |
| CCA | ACA | CCC | CTG | CTA | TAC | AGA | CTG | GGC | GCT | GTT | CAG | AAT | GAA | ATC | ACC | CTG | ACG | CAC | CCA |
|     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 630 |     | 632 |     |     |     |
| V   | T   | K   | Y   | I   | M   | T   | C   | M   | S   | A   | D   | L   | E   | V   | V   | T   | OP  |     |     |
| GTC | ACC | AAA | TAC | ATC | ATG | ACA | TGC | ATG | TCG | GCC | GAC | CTG | GAG | GTC | GTC | ACG | TGA |     |     |

FIG. 6C

```

      1                               10
      M G C V V I V G R V V L S G S
      ATG GGC TGC GTG GTC ATA GTG GGC AGG GTC GTC TTG TCC GGT TCC

      20                               30
      G S I T A Y A Q Q T R G L L G C I I T S
      GGT TCC ATC ACT GCT TAC GCT CAA CAA ACC AGA GGC CTC CTA GGG TGC ATA ATC ACC AGC

      40                               50
      L T G R D K N Q V E G E V Q I V S T A A
      CTA ACT GGC CGG GAC AAA AAC CAA GTG GAG GGT GAG GTC CAG ATT GTG TCA ACT GCT GCC

      60                               70
      Q T F L A T C I N G V C W T V Y H G A G
      CAA ACC TTC CTG GCA ACG TGC ATC AAT GGG GTG TGC TGG ACT GTC TAC CAC GGG GCC GGA

      80                               90
      T R T I A S P K G P V I Q M Y T N V D Q
      ACG AGG ACC ATC GCG TCA CCC AAG GGT CCT GTC ATC CAG ATG TAT ACC AAT GTA GAC CAA

      100                              110
      D L V G W P A P Q G S R S L T P C T C G
      GAC CTT GTG GGC TGG CCC GCT CCG CAA GGT AGC CGA TCA TTG ACA CCC TGC ACT TGC GGC

      120                              130
      S S D L Y L V T R H A D V I P V R R R G
      TCC TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC GCC GAT GTC ATT CCC GTG CGC CGG CGG GGT

      140                              150
      D S R G S L L S P R P I S Y L K G S A G
      GAT AGC AGG GGC AGC CTG CTG TCG CCC CGG CCC ATT TCC TAC TTG AAA GGC TCC GCA GGG

      160                              170
      G P L L C P A G H A V G I F R A A V C T
      GGT CCG CTG TTG TGC CCC GCG GGG CAC GCC GTG GGC ATA TTT AGG GCC GCG GTG TGC ACC

      180                              190
      R G V A K A V D F I P V E N L E T T M R
      CGT GGA GTG GCT AAG GCG GTG GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC CTA GAG ACA ACC ATG AGG

      200                              210
      S P V F T D N S S P P V V P Q S F Q V A
      TCC CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCA GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT

      220                              230
      H L H A P T G S G K S T K V P A A Y A A
      CAC CTC CAT GCT CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA GCT

      240                              250
      Q G Y K V L V L N P S V A A T L G F G A
      CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA ACA CTG GGC TTT GGT GCT

      260                              270
      Y M S K A H G I D P N I R T G V R T I T
      TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC

```

FIG. 7A

T G S ~~PETIUS05/30825~~ G K F L A D G G C S  
 ACT GGC AGC CCC ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC TCG  
 280 290  
 G G A Y D I I I C D E C H S T D A T S I  
 GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC ACG GAT GCC ACA TCC ATC  
 300 310  
 L G I G T V L D Q A E T A G A R L V V L  
 TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA GCA GAG ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC  
 320 330  
 A T A T P P G S V T V P H P N I E E V A  
 GCC ACC GCC ACC CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT GCT  
 340 350  
 L S T T G E I P F Y G K A I P L E V I K  
 CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC CCC CTC GAA GTA ATC AAG  
 360 370  
 G G R H L I F C H S K K K C D E L A A K  
 GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG  
 380 390  
 L V A L G I N A V A Y Y R G L D V S V I  
 CTG GTC GCA TTG GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC ATC  
 400 410  
 P P I G D V V V V A T D A L M T G Y T G  
 CCG CCC ATC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC ATG ACC GGC TAT ACC GGC  
 420 430  
 D F D S V I D C N T C V T Q T V D F S L  
 GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT ACG TGT GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT  
 440 450  
 D P T F T I E T I T L P Q D A V S R T Q  
 GAC CCT ACC TTC ACC ATT GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CGC ACT CAA  
 460 470  
 R R G R T G R G K P G I Y R F V A P G E  
 CGT CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA TTT GTG GCA CCG GGG GAG  
 480 490  
 R P S G M F D S S V L C E C Y D A G C A  
 CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT  
 500 510  
 W Y E L T P A E T T V R L R A Y M N T P  
 TGG TAT GAG CTC ACG CCC GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC CCG  
 520 530  
 G L P V C Q D H L E F W E G V F T G L T  
 GGG CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC GTC TTT ACA GGC CTC ACT  
 540 550  
 H I D A H F L S Q T K Q S G E N L P Y L  
 CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG ACA AAG CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT TAC CTG  
 560 570

FIG. 7B

V A Y <sup>580</sup> ~~PCTA/US05/30826~~ A Q A P P P <sup>590</sup> S W D Q  
 GTA GCG TAC CAA GCC ACC GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC CAG  
 M W K C <sup>600</sup> L I R L K P T L H G P <sup>610</sup> T P L L Y  
 ATG TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG CCA ACA CCC CTG CTA TAC  
 R L G A <sup>620</sup> V Q N E I T L T H P <sup>630</sup> V T K Y I M  
 AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC ACC CTG ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG  
 T C M S <sup>640</sup> A D L E V V <sup>646</sup> T OP  
 ACA TGC ATG TCG GCC GAC CTG GAG GTC GTC ACG TGA

FIG. 7C

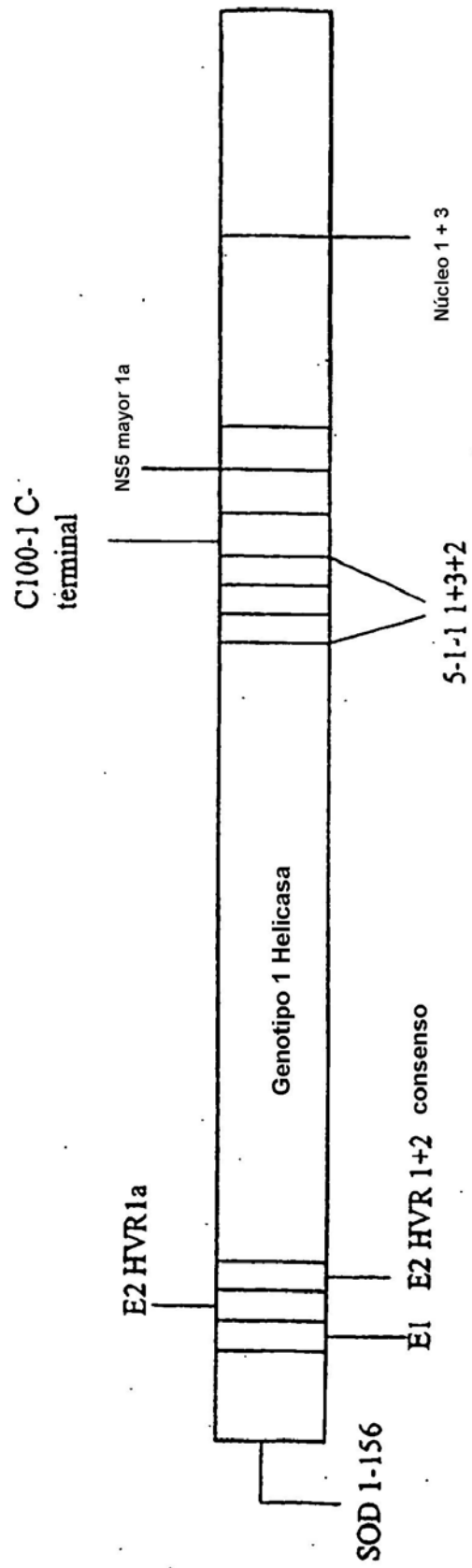


FIG. 8

```

      1                               10
M   A   T   K   A   V   C   V   L   K   G   D   G   P   V
ATG GCT ACA AAG GCT GTT TGT GTT TTG AAG GGT GAC GGC CCA GTT

      20                               30
Q   G   I   I   N   F   E   Q   K   E   S   N   G   P   V
CAA GGT ATT ATT AAC TTC GAG CAG AAG GAA AGT AAT GGA CCA GTG

      40
K   V   W   G   S   I   K   G   L   T   E   G   L   H   G
AAG GTG TGG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT GAA GGC CTG CAT GGA

      50                               60
F   H   V   H   E   F   G   D   N   T   A   G   C   T   S
TTC CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT

      70
A   G   P   H   F   N   P   L   S   R   K   H   G   G   P
GCA GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA TCC AGA AAA CAC GGT GGG CCA

      80                               90
K   D   E   E   R   H   V   G   D   L   G   N   V   T   A
AAG GAT GAA GAG AGG CAT GTT GGA GAC TTG GGC AAT GTG ACT GCT

      100
D   K   D   G   V   A   D   V   S   I   E   D   S   V   I
GAC AAA GAT GGT GTG GCC GAT GTG TCT ATT GAA GAT TCT GTG ATC

      110                               120
S   L   S   G   D   H   C   I   I   G   R   T   L   V   V
TCA CTC TCA GGA GAC CAT TGC ATC ATT GGC CGC ACA CTG GTG GTC

      130
H   E   K   A   D   D   L   G   K   G   G   N   E   E   S
CAT GAA AAA GCA GAT GAC TTG GGC AAA GGT GGA AAT GAA GAA AGT

      140                               150
T   K   T   G   N   A   G   S   R   L   A   C   G   V   I
ACA AAG ACA GGA AAC GCT GGA AGT CGT TTG GCT TGT GGT GTA ATT

      160
G   I   A   Q   N   L   N   S   G   C   N   C   S   I   Y
GGG ATC GCC CAG AAT TTG AAT TCT GGT TGC AAT TGC TCT ATC TAT

      170                               180
P   G   H   I   T   G   H   R   M   A   W   K   L   G   S
CCC GGC CAT ATA ACG GGT CAC CGC ATG GCA TGG AAG CTT GGT TCC

      190
A   A   R   T   T   S   G   F   V   S   L   F   A   P   G
GCC GCC AGA ACT ACC TCG GGC TTT GTC TCC TTG TTC GCC CCA GGT

```

FIG. 9A

```

                200                                210
    A   K   Q   N   E   T   H   V   T   G   G   A   A   A   R
GCC AAA CAA AAC GAA ACT CAC GTC ACG GGA GGC GCA GCC GCC CGA

                220
    T   T   S   G   L   T   S   L   F   S   P   G   A   S   Q
ACT ACG TCT GGG TTG ACC TCT TTG TTC TCC CCA GGT GCC AGC CAA

                230                                240
    N   I   Q   L   I   V   D   F   I   P   V   E   N   L   E
AAC ATT CAA TTG ATT GTC GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC CTA GAG

                250
    T   T   M   R   S   P   V   F   T   D   N   S   S   P   P
ACA ACC ATG CGA TCT CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCA

                260                                270
    V   V   P   Q   S   F   Q   V   A   H   L   H   A   P   T
GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT CCC ACA

                280
    G   S   G   K   S   T   K   V   P   A   A   Y   A   A   Q
GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA GCT CAG

                290                                300
    G   Y   K   V   L   V   L   N   P   S   V   A   A   T   L
GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA ACA CTG

                310
    G   F   G   A   Y   M   S   K   A   H   G   I   D   P   N
GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT CCT AAC

                320                                330
    I   R   T   G   V   R   T   I   T   T   G   S   P   I   T
ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC ATC ACG

                340
    Y   S   T   Y   G   K   F   L   A   D   G   G   C   S   G
TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC TCG GGG

                350                                360
    G   A   Y   D   I   I   I   C   D   E   C   H   S   T   D
GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC ACG GAT

                370
    A   T   S   I   L   G   I   G   T   V   L   D   Q   A   E
GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA GCA GAG

                380                                390
    T   A   G   A   R   L   V   V   L   A   T   A   T   P   P
ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC CCT CCG

```

FIG. 9B

```

                                400
    G   S   V   T   V   P   H   P   N   I   E   E   V   A   L
    GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT GCT CTG

                                410                                420
    S   T   T   G   E   I   P   F   Y   G   K   A   I   P   L
    TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC CCC CTC

                                430
    E   V   I   K   G   G   R   H   L   I   F   C   H   S   K
    GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG

                                440                                450
    K   K   C   D   E   L   A   A   K   L   V   A   L   G   I
    AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG GGC ATC

                                460
    N   A   V   A   Y   Y   R   G   L   D   V   S   V   I   P
    AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG

                                470                                480
    T   S   G   D   V   V   V   V   A   T   D   A   L   M   T
    ACC AGC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC ATG ACC

                                490
    G   Y   T   G   D   F   D   S   V   I   D   C   N   T   C
    GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT ACG TGT

                                500                                510
    V   T   Q   T   V   D   F   S   L   D   P   T   F   T   I
    GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC ACC ATT

                                520
    E   T   I   T   L   P   Q   D   A   V   S   R   T   Q   R
    GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CGC ACT CAA CGT

                                530                                540
    R   G   R   T   G   R   G   K   P   G   I   Y   R   F   V
    CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA TTT GTG

                                550
    A   P   G   E   R   P   S   G   M   F   D   S   S   V   L
    GCA CCG GGG GAG CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC

                                560                                570
    C   E   C   Y   D   A   G   C   A   W   Y   E   L   T   P
    TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC ACG CCC

                                580
    A   E   T   T   V   R   L   R   A   Y   M   N   T   P   G
    GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG

```

FIG. 9C

```

                    590                                     600
    L   P   V   C   Q   D   H   L   E   F   W   E   G   V   F
    CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC GTC TTT

                    610
    T   G   L   T   H   I   D   A   H   F   L   S   Q   T   K
    ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG ACA AAG

                    620                                     630
    Q   S   G   E   N   L   P   Y   L   V   A   Y   Q   A   T
    CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA GCC ACC

                    640
    V   C   A   R   A   Q   A   P   P   P   S   W   D   Q   M
    GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC CAG ATG

                    650                                     660
    W   K   C   L   I   R   L   K   P   T   L   H   G   P   T
    TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG CCA ACA

                    670
    P   L   L   Y   R   L   G   A   V   Q   N   E   I   T   L
    CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC ACC CTG

                    680                                     690
    T   H   P   V   T   K   Y   I   M   T   C   M   S   A   D
    ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG GCC GAC

                    700
    L   E   V   V   T   S   A   C   S   G   K   P   A   I   I
    CTG GAG GTC GTC ACG AGC GCA TGC TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA

                    710                                     720
    P   D   R   E   V   L   Y   R   E   F   D   E   M   E   E
    CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG

                    730
    C   S   Q   H   L   P   Y   I   E   Q   G   M   M   L   A
    TGC TCT CAG CAC TTA CCG TAC ATC GAG CAA GGG ATG ATG CTC GCC

                    740                                     750
    E   Q   F   K   Q   K   A   L   G   L   S   R   G   G   K
    GAG CAG TTC AAG CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CGA GGG GGC AAG

                    760
    P   A   I   V   P   D   K   E   V   L   Y   Q   Q   Y   D
    CCG GCA ATC GTT CCA GAC AAA GAG GTG TTG TAT CAA CAA TAC GAT

                    770                                     780
    E   M   E   E   C   S   Q   A   A   P   Y   I   E   Q   A
    GAG ATG GAA GAG TGC TCA CAA GCT GCC CCA TAT ATC GAA CAA GCT

```

FIG. 9D

790  
 Q V I A H Q F K E K V L G L I  
 CAG GTA ATA GCT CAC CAG TTC AAG GAA AAA GTC CTT GGA TTG ATC  
 800  
 D N D Q V V V T P D K E I L Y  
 GAT AAT GAT CAA GTG GTT GTG ACT CCT GAC AAA GAA ATC TTA TAT  
 820  
 E A F D E M E E C A S K A A L  
 GAG GCC TTT GAT GAG ATG GAA GAA TGC GCC TCC AAA GCC GCC CTC  
 830  
 I E E G Q R M A E M L K S K I  
 ATT GAG GAA GGG CAG CGG ATG GCG GAG ATG CTC AAG TCT AAG ATA  
 850  
 Q G L L G I L R R H V G P G E  
 CAA GGC CTC CTC GGG ATA CTG CGC CGG CAC GTT GGT CCT GGC GAG  
 860  
 G A V Q W M N R L I A F A S R  
 GGG GCA GTG CAG TGG ATG AAC CGG CTG ATA GCC TTC GCC TCC AGA  
 880  
 G N H V S P T H Y V P S R S R  
 GGG AAC CAT GTT TCC CCC ACG CAC TAC GTT CCG TCT AGA TCC CGG  
 890  
 R F A Q A L P V W A R P D Y N  
 AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC  
 910  
 P P L V E T W K K P D Y E P P  
 CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT  
 920  
 V V H G R S S R R F A Q A L P  
 GTG GTC CAC GGC AGA TCT TCT CGG AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC  
 940  
 V W A R P D Y N P P L V E T W  
 GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG  
 950  
 K K P D Y E P P V V H G R K T  
 AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAT GGC AGA AAG ACC  
 970  
 K R N T N R R P Q D V K F P G  
 AAA CGT AAC ACC AAC CGG CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT

FIG. 9E

|     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|
|     |     |     |     | 980  |     |     |     |     |     |      |     |     |     | 990 |      |
| G   | G   | Q   | I   | V    | G   | R   | R   | G   | P   | P    | I   | P   | K   | A   |      |
| GGC | GGT | CAG | ATC | GTT  | GGT | CGC | AGG | GGC | CCT | CCT  | ATC | CCC | AAG | GCT |      |
|     |     |     |     |      |     |     |     |     |     | 1000 |     |     |     |     |      |
| R   | R   | P   | E   | G    | R   | T   | W   | A   | Q   | P    | G   | Y   | P   | W   |      |
| CGT | CGG | CCC | GAG | GGC  | AGG | ACC | TGG | GCT | CAG | CCC  | GGT | TAC | CCT | TGG |      |
|     |     |     |     | 1010 |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     | 1020 |
| P   | L   | Y   | G   | N    | K   | D   | R   | R   | S   | T    | G   | K   | S   | W   |      |
| CCC | CTC | TAT | GGC | AAT  | AAG | GAC | AGA | CGG | TCT | ACA  | GGT | AAG | TCC | TGG |      |
|     |     |     |     |      |     |     |     |     |     | 1030 |     |     |     |     |      |
| G   | K   | P   | G   | Y    | P   | W   | P   | R   | K   | T    | K   | R   | N   | T   |      |
| GGT | AAG | CCA | GGG | TAC  | CCT | TGG | CCA | AGA | AAG | ACC  | AAA | CGT | AAC | ACC |      |
|     |     |     |     | 1040 |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     | 1050 |
| N   | R   | R   | P   | Q    | D   | V   | K   | F   | P   | G    | G   | G   | Q   | I   |      |
| AAC | CGA | CGG | CCG | CAG  | GAC | GTC | AAG | TTC | CCG | GGT  | GGC | GGT | CAG | ATC |      |
|     |     |     |     |      |     |     |     |     |     | 1060 |     |     |     |     |      |
| V   | G   | R   | R   | G    | P   | P   | I   | P   | K   | A    | R   | R   | P   | E   |      |
| GTT | GGT | CGC | AGG | GGC  | CCT | CCT | ATC | CCC | AAG | GCT  | CGT | CGG | CCC | GAG |      |
|     |     |     |     | 1070 |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     | 1080 |
| G   | R   | T   | W   | A    | Q   | P   | G   | Y   | P   | W    | P   | L   | Y   | G   |      |
| GGC | AGG | ACC | TGG | GCT  | CAG | CCC | GGT | TAC | CCT | TGG  | CCC | CTC | TAT | GGC |      |
|     |     |     |     |      |     |     |     |     |     | 1090 |     |     |     |     |      |
| N   | K   | D   | R   | R    | S   | T   | G   | K   | S   | W    | G   | K   | P   | G   |      |
| AAT | AAG | GAC | AGA | CGG  | TCT | ACC | GGT | AAG | TCC | TGG  | GGT | AAG | CCA | GGG |      |
|     |     |     |     | 1099 |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |
| Y   | P   | W   | P   |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |
| TAT | CCT | TGG | CCC |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |

FIG. 9F

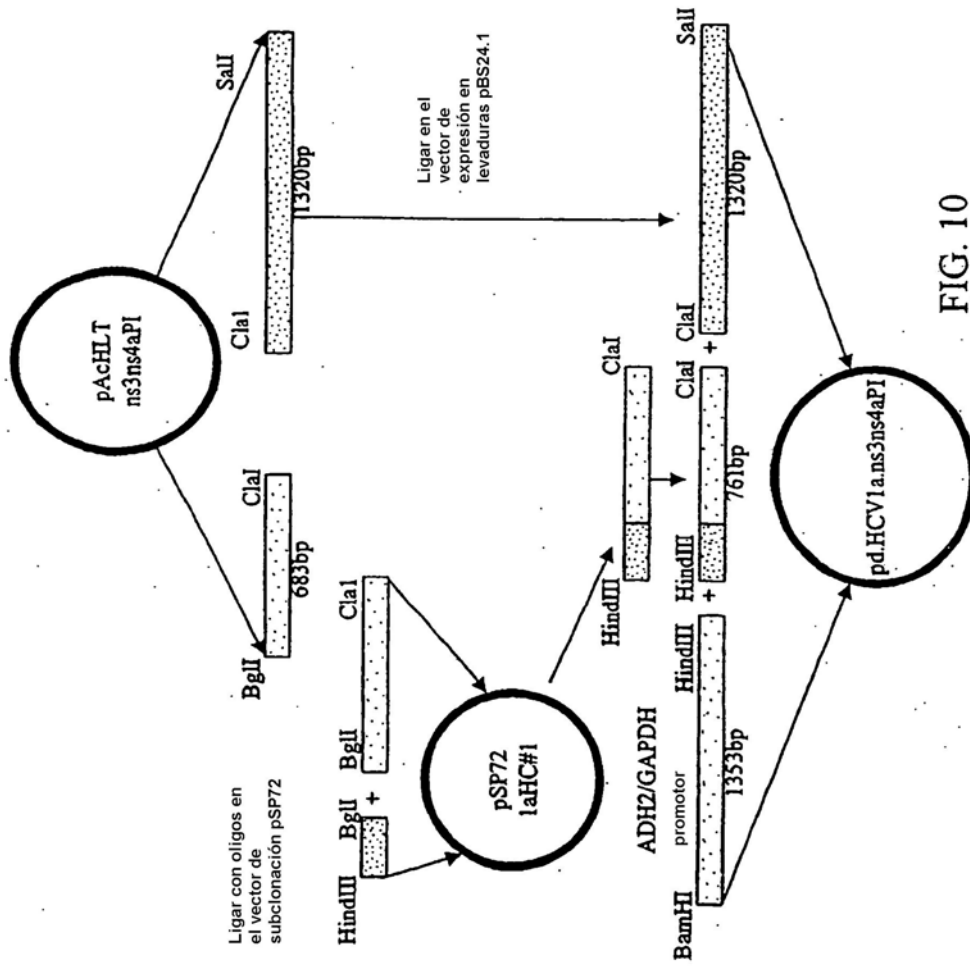


FIG. 10

ANTÍGENO MEFA-3

| hSOD-<br>(1-154) | NÚCLEO   | NÚCLEO   | c33c         | 5-1-1<br>tipo 1 | 5-1-1<br>tipo 3 | 5-1-1<br>tipo 2 | C-100        | C-100        | NS5          | NS5          |
|------------------|----------|----------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| AMINO<br>ÁCIDOS  | 10<br>53 | 10<br>53 | 1192<br>1457 | 1694<br>1735    | 1694<br>1735    | 1694<br>1735    | 1901<br>1940 | 1901<br>1940 | 2278<br>2310 | 2278<br>2310 |

FIG. 11A

ANTÍGENO MEFA-5

| hSOD-<br>(1-154) | NÚCLEO   | NÚCLEO   | E1         | E2         | c33c         | 5-1-1<br>tipo 1 | 5-1-1<br>tipo 3 | 5-1-1<br>tipo 2 | C-100        | NS5          |
|------------------|----------|----------|------------|------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|--------------|
| AMINO<br>ÁCIDOS  | 10<br>53 | 10<br>53 | 303<br>320 | 405<br>444 | 1192<br>1457 | 1689<br>1735    | 1689<br>1735    | 1689<br>1735    | 1901<br>1940 | 2278<br>2313 |

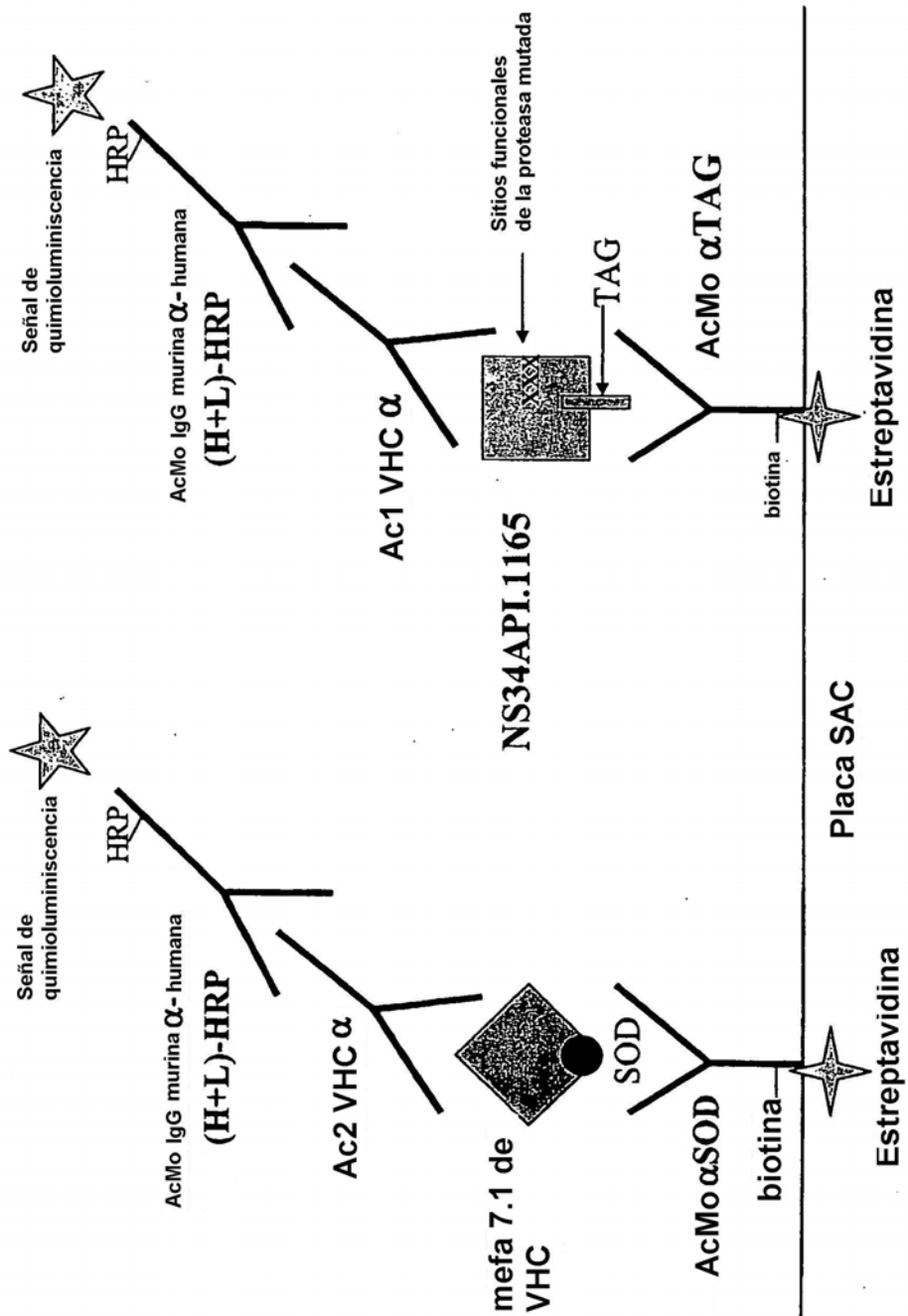
FIG. 11B

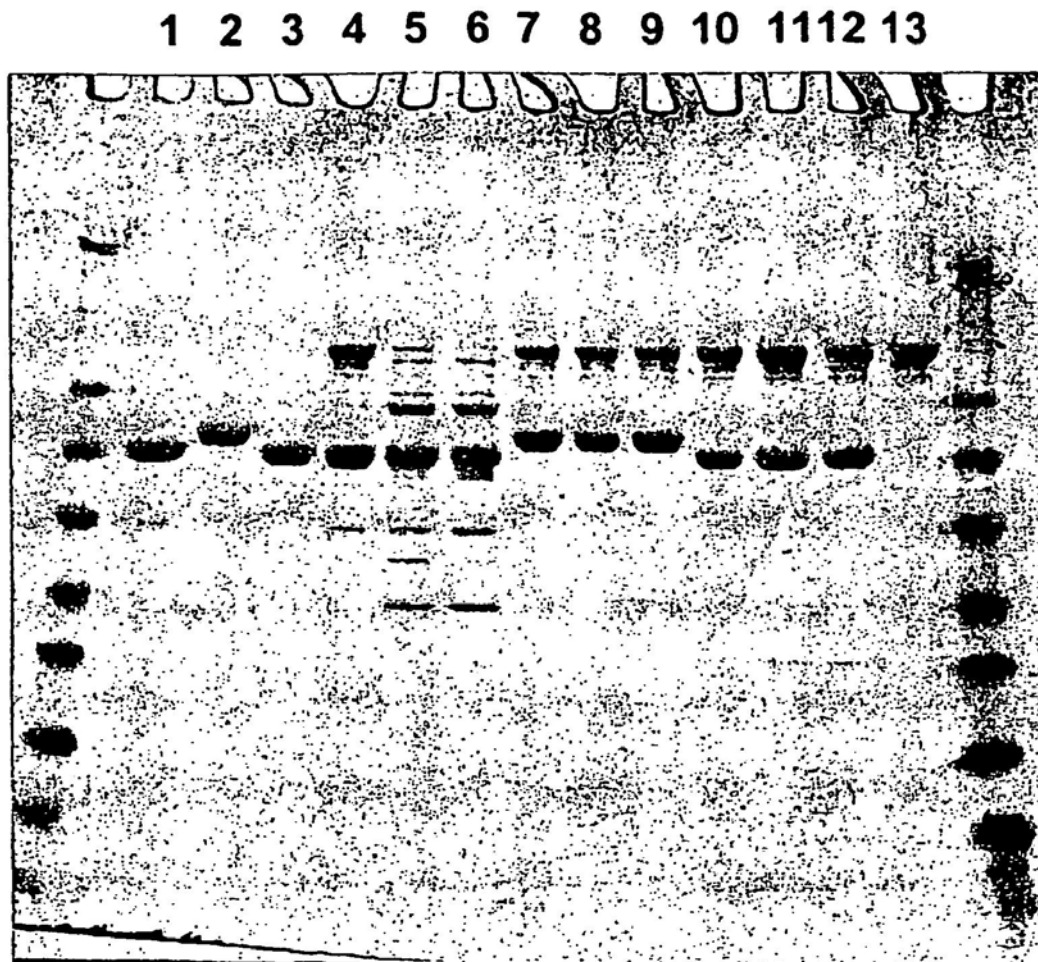
ANTÍGENO MEFA-6

| hSOD-<br>(1-154) | E1         | E2         | c33c         | 5-1-1<br>tipo 1 | 5-1-1<br>tipo 3 | 5-1-1<br>tipo 2 | C-100        | NS5          | NÚCLEO   | NÚCLEO   |
|------------------|------------|------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|--------------|----------|----------|
| AMINO<br>ÁCIDOS  | 303<br>320 | 405<br>444 | 1192<br>1457 | 1689<br>1735    | 1689<br>1735    | 1689<br>1735    | 1901<br>1940 | 2278<br>2313 | 10<br>53 | 10<br>53 |

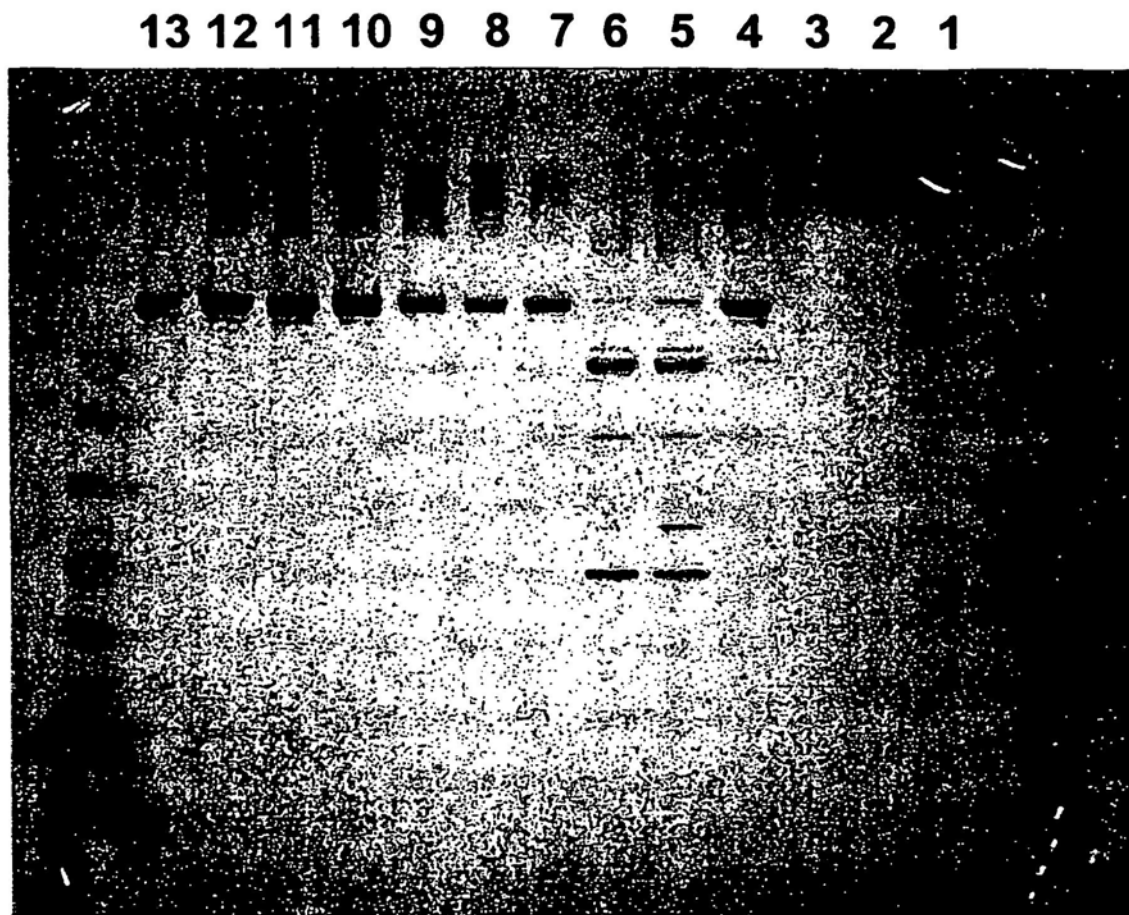
FIG 11C

FIGURA 12





**FIGURA 13**



**FIGURA 14**